

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

***Pseudomonas putida* geenide *gacS* ja PP_1651 promootorid**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Johanna Hendrikson

Juhendaja PhD Riho Teras

TARTU 2019

Infoleht

***Pseudomonas putida* geenide *gacS* ja PP_1651 promootorid**

Pseudomonas putida on laialdase levikuga bakter, keda leidub nii vees kui mullas. Gram-negatiivne bakter koloniseerib eelisatult taimede risosfääri, kus moodustab juurtele biofilmi. Biofilmi moodustumise regulatsioonis osaleb kahekomponendiline süsteem GacS/GacA. Kuigi meie laboris on varasemalt uuritud Fis-i mõju *gacS*-ile, on *gacS*-i transkriptsiooni regulatsioonist vähe teada. Antud töö eesmärk oli tuvastada *gacS* ning vastasahelal paikneva, raua homeostaasis osaleva geeni PP_1651 promootorid. Töö tulemusena leiti geenil *gacS* kaks promootorit ning tuvastati PP_1651 ees kaks piirkonda, kus võiks olla promootorid.

Märksõnad: *Pseudomonas putida* KT2440, biofilm, GacS/GacA signaalisüsteem, promootor, ekskludon

CERCS kood ja nimetus: B220 – geneetika, tsütogeneetika, B230 – mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Promoters of genes *gacS* and PP_1651 in *Pseudomonas putida*

P. putida is a gram-negative soil bacterium that is well-known to form biofilms on plant roots. The global two-component signal transduction system GacS/GacA has been reported to positively regulate biofilm formation. Despite the importance of GacS/GacA system on controlling the production of secondary metabolites, little is known about the transcriptional regulation of sensor kinase *gacS*. Therefore, the aim of the present study is to identify promoter(s) of gene *gacS* and divergent gene PP_1651. As a result, two promoters for the *gacS* were identified, furthermore, two upstream regions of PP_1651 were also determined for potential promoters.

Keywords: *Pseudomonas putida* KT2440, biofilm, GacS/GacA signal transduction system, promoter, excludon

CERCS code and designation: B220 – genetics, cytogenetics
B230 – microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Infoleht | 2 |
| Sisukord | 3 |
| Sissejuhatus | 4 |
| Lühendid | 5 |
| 1. Kirjanduse ülevaade | 6 |
| 1.1 GacS/GacA signaalisüsteem..... | 6 |
| 1.2 Geen PP_1651 ja raua omastamine..... | 9 |
| 1.3 Mittekodeerivad RNA-d ja ekskludoniga geeniekspressiooni reguleerimine..... | 13 |
| 2. Eksperimentaalosa..... | 16 |
| 2.1 Töö eesmärk..... | 16 |
| 2.2 Materjal ja metoodika..... | 16 |
| 2.2.1 Töös kasutatud bakteritüved, nende kasvatamistingimused ja plasmiidid | 16 |
| 2.2.2 Promootorala-konstruktide kloneerimine transkriptsioonivektorisse pBLKT' | 21 |
| 2.2.3 PCR | 22 |
| 2.2.4 Plasmiidse DNA eraldamine ning geelelektroforees..... | 23 |
| 2.2.5 DNA sekveneerimine..... | 23 |
| 2.2.6 Kompetentide valmistamine ja rakkude elektroporatsioon | 24 |
| 2.2.7 β -galaktosidaasi eriaktiivsuse määramine | 24 |
| 2.2.8 Statistiline analüüs | 25 |
| 2.3 Tulemused..... | 26 |
| 2.3.1 Geeni <i>gacS</i> promootorala lühendamine 5' otsast | 26 |
| 2.3.2 Potentsiaalse promootori -10 elemendi muteerumine ja geeni <i>gacS</i> promootorala lühendamine 3' otsast..... | 28 |
| 2.3.3 Geeni PP_1651 promootorite tuvastamine | 30 |
| 2.4 Arutelu | 33 |
| Kokkuvõte | 37 |
| Summary..... | 38 |
| Kasutatud kirjandus..... | 39 |
| Kasutatud veebiaadressid..... | 46 |

Sissejuhatus

Enamik ökosüsteemides olevaid baktereid elab biofilmis. Niisamuti on *Pseudomonas putida* võimeline koloniseerima taimede risosfääri ja moodustama juurtele biofilmi. *P. putida* tõrjub taimpatogeene, indutseerides taimedele süstemaatilist resistentsust, tootes antimikroobseid ühendeid ja T6SS (tüüp kuus sekretsioonisüsteemi) ekspresseerimisega.

Biofilmis olemine pakub mitmeid eeliseid, näiteks paremat kaitset kahjulike keskkonnamõjude eest nagu UV kiirgus, mitteoptimaalne pH, soolsus, antibiootikumid või veepuudus. Kuid bakterid moodustavad biofilmi ka vastusena toitaineküllusele, eesmärgiga jääda soodsasse keskkonda püsima. Üleminekut biofilmi fenotüübilt vastandlikule aktiivsele liikumisele reguleerib muuhulgas globaalne kahekomponendiline süsteem GacS/GacA, mis lülitades sisse sRNA-de ekspressiooni inhibeerib liikumisega seotud geene ja soodustab sessiilseks eluks vajalike geenide ekspressiooni. Hoolimata GacS/GacA olulisest rollist sekundaarsete metaboliitide ja ekstratsellulaarsete ühendite tootmisel ei ole *gacS*-i transkriptsiooni regulatsiooni kuigi hästi uuritud.

Eelnevast tööst meie laboris on teada, et globaalne regulaator Fis seondub *gacS*-i promootoralale, kuid *gacS*-i transkriptsiooni regulatsiooni täpsemaks uurimiseks on oluline teada geeni promootoreid. Seega sai käesoleva töö eesmärgiks tuvastada geeni *gacS* promootorid. Kuna töö käigus kujunes hüpotees, et sensorkinaasi ekspressioon võib olla reguleeritud ekskludoniga, alustati tööd ka vastasahelal asuva geeni PP_1651 promootorite leidmiseks.

Eraldi tahaksin tänada Heili Ilvest plasmiidide konstrueerimise eest.

Lühendid

EPS – eksopolüsahhariidid

Fis– reguleeriv valk (*factor for Inversion Stimulation*)

GacA– kahekomponendilise süsteemi GacA/GacA vastuse regulaator (*global activator*)

GacS– kahekomponendilise süsteemi GacA/GacA sensorkinaas (*global activator*)

KKS– kahekomponendiline süsteem

Km– antibiootikum kanamütsiin

LadS– sensorkinaas (*lost adherence sensor*)

LapA– biofilmi adhesiin valk (*lipopolysaccharide assembly protein A*)

LB– Luria-Bertani täissööde (*lysogeny broth*)

MÜ– Milleri ühik

nt– nukleotiid

OD– optiline tihedus (*optical density*)

ONPG– orto-nitrofenüül-β-D-galaktopüranosiid

PMF– prootonite liikumapanev jõud (*proton-motive force*)

RACE– RNA 5' otsa määramise meetod (*rapid amplification of cDNA ends*)

RetS– sensorkinaas (*regulator of exopolysaccharide and type III secretion*)

RsmA– reguleeriv valk (*repressor of secondary metabolites*)

RsmY/Z/X– mittekodeeriv reguleeriv sRNA

UTR– mittetransleeritav järjestus (*untranslated region*)

X-gal– 5-bromo-4-kloor-3-indool-β-D-galaktopüranosiid

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 GacS/GacA signaalisüsteem

Kahekomponendilised süsteemid (KKS) koosnevad, nagu nimi ütleb, kahest osast: sensorkinaasist ja vastuse regulaatorist (Stock jt. 2000). Kahekomponentsed süsteemid võimaldavad bakteritel kohaneda muutuvate tingimustega vahendades keskkonnast või raku seest tulevaid signaale. Kahekomponendilised süsteemid on enim levinud bakteritel, aga neid on kirjeldatud ka arhedel ning eukarüootidel, näiteks pärmil *Saccharomyces cerevisiae* ja taimel *Arabidopsis thaliana* (Koretke jt., 2000; Loomis jt., 1997; Wolanin jt., 2002).

Tsütoplasma membraanis paiknev sensorkinaas võtab vastu keskkonnast või raku seest tuleva signaali ja autofosforüleerub. Autofosforüleerunud sensor fosforüleerib tsütoplasmas asuva signaalsüsteemile spetsiifilise vastuseregulaatori, mis seejärel aktiveerub (Stock jt., 2000). Suurem osa vastuseregulaatoreid, nagu näiteks GacA, seob DNA-d, kuid mõnel juhul seovad vastuseregulaatorid ka valke, RNA-d või on ensümaatilise aktiivsusega (Gao jt., 2007; Lapouge jt., 2008).

GacS on osa GacS/GacA kahekomponendilise süsteemist, kus GacS on hübriidne sensorkinaas ja GacA vastuse regulaator (Pernestig jt., 2001). GacS sisaldab mitut aminohappejääki, need aminohappejäägid fosforüleeritakse kaskaadina autofosforüleerumise käigus. Bakteris *Pseudomonas aeruginosa* seondub veel tundmatu faktor sensorkinaasiga GacS, mille tagajärjel toimub konserveerunud histidiinjäägi (H1) autofosforülatsioon. Fosfaatrühm pärineb ATP-lt. Seejärel kantakse fosfaatrühm GacS-i aspartaadi (D), ning edasi histidiini jäägile (H2). GacS-lt fosfaatrühma ülekanne GacA N-terminuses asuvale aspartaadile aktiveerib vastuseregulaatori (Pernestig jt., 2001). Fosforüleeritud GacA aktiveerib *P. aeruginosa*'s kahe väikse RNA geeni (sRNA), *rsmY* ja *rsmZ*, transkriptsiooni (Kay et al., 2006), seondudes promootoritest ülesvoolu jäävatele konserveerunud elementidele nn GacA *box*-idele (Heeb ja Haas, 2001; Kay jt., 2005). Väikeste RNA geenide transkriptsioon on erinevalt reguleeritud. Näiteks *rsmZ* geeni promootoralaga seondub H-NS (*heat-stable nucleoid-structuring protein*), mis repressseerib *rsmZ*-i transkriptsiooni. Seejuures *rsmY* ekspressioonile H-NS-il mõju pole (Brencic jt., 2009).

The diagram illustrates the GacS/GacA signaling pathway. At the top, three blue ovals represent the transducers: RetS, GacS, and LadS. RetS and LadS have dashed yellow arrows pointing to GacS, indicating inhibition. GacS has a solid black arrow pointing to a green box labeled GacA. GacA is then phosphorylated, shown as an orange box labeled GacA^P. This phosphorylated GacA activates the RsmY/Z complex, represented by a blue trimeric structure. The RsmY/Z complex then inhibits the RsmY/Z:RsmA complex, shown as a red trimeric structure. The RsmY/Z:RsmA complex inhibits the expression of T3SS and EPS. T3SS leads to Virulence, and EPS leads to Biofilm.

7

Seniajani pole väga palju informatsiooni, mis signaali GacS keskkonnast tunnetab. On teada, et *E. coli* GacS-i homoloog BarA on seotud orgaaniliste hapete nagu atsetaadi ja formiaadi kogunemise tunnetamisega keskkonda (Chavez jt., 2010). Siiski on ühise, GacS-i aktiveeriva signaali olemasolu ebatõenäoline kuna periplasmaatiline sensordomeen on bakterite vahel halvasti konserveerunud (Heeb ja Haas, 2001).

P. aeruginosa GacS/GacA signaalirada reguleerivad veel kaks hübriidset sensorkinaasi RetS ja LadS (Goodman jt., 2004; Ventre jt., 2006). Sensorkinaasid LadS ja RetS avaldavad GacS/GacA süsteemile vastupidist mõju, esimene soodustab akuutse infektsiooniga seotud geenide ekspressiooni, teine kroonilisele infektsioonile omase biofilmi kujunemist. RetS võib GacS-i mõjutada kolmel moel: moodustada heterodimeere GacS-iga, pärssides nii GacA autofosforüleerimist; eemaldada fosfaatrühma fosforüülitud GacS-ilt või RetS kiirendab GacS-i defosforülatsiooni (Francis jt., 2018; Goodman jt., 2009). LadS soodustab fosfaatjäägi ülekannet LadS-i REC-domeenist GacS-i Hpt-domeeni ning sellega soodustab GacS-i signaali ülekandumist GacA-le (Chambonnier jt., 2016)

GacS/GacA signaalsüsteemi abil on *P. aeruginosa* võimeline reguleerima üleminekut planktiliselt eluviisilt sessiilsele eluviisile. Planktilist eluviisiga seostub näiteks liikumise seotud geenide, virulentsusfaktorite ning tüüp III sekretsioonisüsteemi ekspresseerimine, mida kasutatakse mitmete efektorvalkude viimiseks peremehe rakkudesse. Sessiilsed rakud moodustavad biofilmi, mis viib kroonilise infektsioonini, iseloomulik on hulgatunnetus molekulide, EPS-ide (ekspolüsahhariidid nt Pel ja Psl) ja tüüp VI SS ekspresseerimine (Burrowes jt., 2006; Gooderham ja Hancock, 2009; Kay jt., 2006; Parkins jt., 2001).

Risofäärse bakteri *P. putida* GacS/GacA signaalsüsteem on väga sarnane *P. aeruginosa* süsteemile. Kuid *P. putida* signaalsüsteemis on faktorid mitme kordusena, näiteks on tal kaks RsmA homoloogi, RsmE ja RsmI ning lisaks sRNA-de RsmY ja RsmZ ka RsmX (Huertas-Rosales jt., 2016).

GacS-süsteemi aktiveerimine mõjutab *P. putida*'s positiivselt biofilmi moodustumist läbi suurenenud adhesiinvalkude transkriptsiooni, spetsiifiliselt LapF-i, mis on oluline küpses biofilmis rakk-rakk interaktsioonide kujunemiseks. GacS/GacA signaalsüsteemi mõju LapF-il on kaudne, signaalsüsteem mõjutab positiivselt alternatiivse sigma faktori RpoS ekspressiooni ning LapF-i

ekspressioon on RpoS-i kontrolli all (Martínez-Gil, 2014; Martínez-Gil jt., 2010). Sellega kooskõlas täheldati Huertas-Rosalesi töös Rsm-mutantidel suurenenud ja varasemat LapF-i ekspressiooni, ning suurenenud EPS-i Peb ekspressiooni. LapA ekspressioonile mõju ei täheldatud (Huertas-Rosalesjt., 2016).

Enne käesolevat tööd oli meie laboris tehtud uurimustest teada, et *P. putida gacS*-i transkriptsiooni võib reguleerida globaalne regulaator Fis (*factor for inversion stimulation*), mis seondub *gacS*-i promootoralale *in vitro* (Lahesaare, 2011) (joonis 2). Samas täheldati *fis*-i üleekspressiooni puhul *P. putida*'s tugevat positiivset mõju biofilmi moodustumisele, kuid ainult nõrka positiivset toimet *gacS*-i ekspressioonile *in vivo* (Moor, 2011; Moor jt., 2014).



Joonis 2. Transkriptsiooni regulaatori Fis seondumissaidid geeni *gacS* promootoralas. Roosas kirjas järjestus märgib Fis-i seondumissaiti ning lilla ning oranž nool tähistavad vastavalt geeni *gacS* ja PP_1651 alguspunkte (joonis põhineb Lahesaare, 2011 ja Moor, 2011 töödel).

1.2 Geen PP_1651 ja raua omastamine

Raud on oluline kofaktor ensümaatilistes reaktsioonides ning tsütokroomide ja mitte-heemsete valkude osana elektronide ülekande (Moat jt., 2002.). Üksikute eranditega, näiteks *Lactobacillae*, vajavad kõik bakterid oma elutegevuseks rauda, keskmiselt 10^5 kuni 10^6 rauaiooni ühe rakugeneratsiooni kohta (Archibald, 1983; Braun ja Killmann, 1999). Kuigi raud on maakoos levinud element, siis raud(III)ioonide halva lahustuvuse tõttu aeroobsetes tingimustes neutraalsel

pH-I on Fe(III) kontsentratsioon keskkonnas madal ja raud on tihti mikroobide kasvu limiteeriv element. Seevastu mikroaeroobsetes või anaeroobsetes tingimustes või happelisel pH-I on levinum vees lahustuv Fe(II) (Andrews jt., 2003). Rauda homöostaasi tuleb rangelt kontrollida, sest aeroobses keskkonnas võib Fe(II) olla toksiline. Raud reageerib reaktiivsete hapniku ühenditega (nagu O_2^- ja H_2O_2) ja Fentoni reaktsioonis tekib äärmiselt reaktiivne ja DNA-d kahjustav hüdroksüül radikaal ($\cdot OH$) (Stadtman ja Berlett, 1991).

Elutähtsa, kuid halvasti lahustuva raua omastamiseks keskkonnast kasutavad mikroorganismid ühe võimalusena siderofoore. Siderofoorid on madalamolekulaarsed, alla 1000 Da, rauda kelaativad ühendid, mida bakterid ja seened toodavad ja omastavad rauavaestes tingimustes (Neilands, 1995). Bakterid on võimelised omastama keskkonnast rauda, kasutades selleks teiste mikroorganismide toodetud siderofoore. Selliste ksenosiderofooride omastamiseks ekspresseerivad bakterid välismembraanile erinevaid TonB sõltuvaid retseptoreid (Cornelis ja Bodilis, 2009; Loper ja Henkels, 1999). Fuorestseeruvatele pseudomonastele on iseloomulik rauavaeguse korral toota kollakasrohelist siderofoori püoverdiini (Meyer ja Abdallah, 1978). Kuid näiteks *P. putida* N1R on võimeline omastama rauda nii enterobaktiini, pseudobaktiin-358 kui aerobaktiini vahendusel (Loper ja Henkels, 1999; Meyer, 1992). *P. aeruginosa* suudab muuhulgas rauda omastada enterobaktiini vahendusel, ekspresseerides välismembraanil retseptorit PfeA (Dean ja Poole, 1993a, 1993b; Poole jt., 1990). Enterobaktiin on väga kõrge afiinsusega siderofoor, mida sekreteerivad gram-negatiivsed bakterid nagu *E. coli* ja *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Raymond jt., 2003).

P. putida operon PP_1651-PP_1652 kodeerib hüpoteetilist kahekomponendilist süsteemi, milles PP_1652 kodeerib sensorit ehk histidiinkinaasi PfeS-II ja PP_1651 vastuseregulaatorit PfeR-II (Winsor jt., 2016).

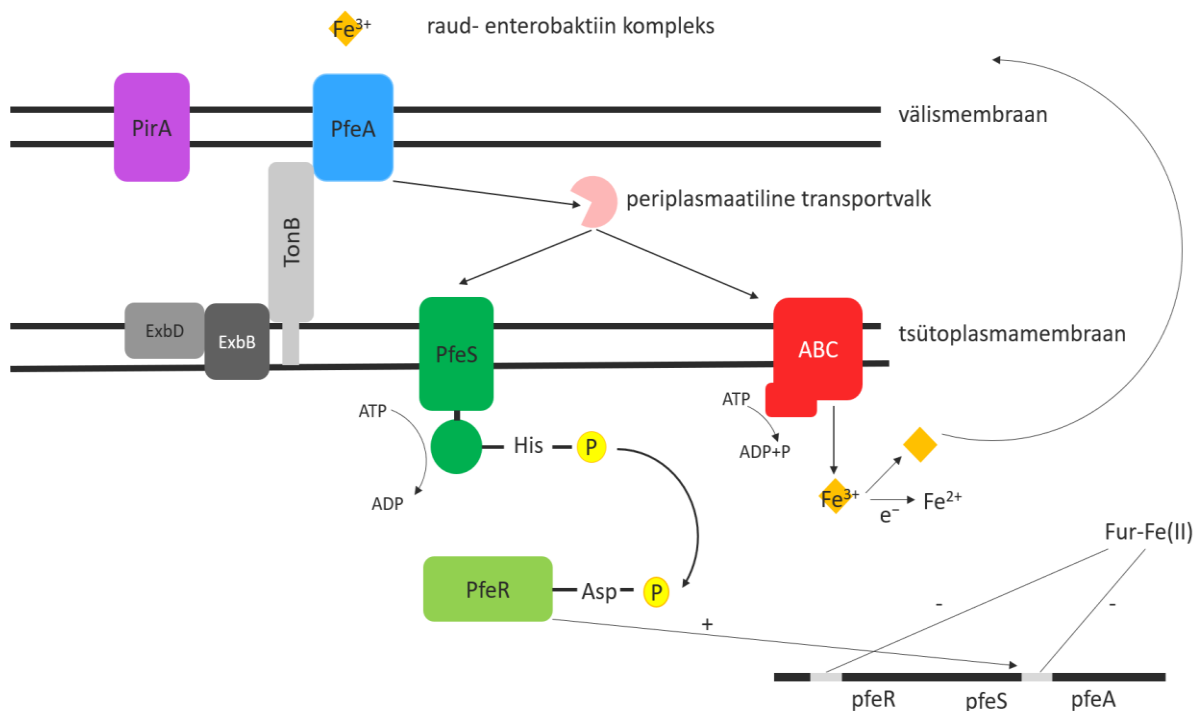
UniProt/Swiss-Prot andmebaasi järgi (blast.ncbi.nlm.nih.gov) on parim vaste *pfeS-II*-e nukleotiidsele järjestusele *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sensor valk PfeS (skoor 415, e- väärtus $3e-141$, kahe järjestuse vaheline sarnasus 52,6%). Samadel tingimustel tehtud päring PP_1651 nukleotiidse järjestuse kohta annab parimaks tulemuseks *P. aeruginosa* PAO1 transkriptsiooni aktivaatori PfeR (skoor 189, $7e-58$ ja identsusprotsent 54,27%). *P. aeruginosa* PfeS valku kodeerib geen *PfeS* (PA2687), valku PfeR geen *PfeR* (PA2686). PfeS/PfeR on oluline enterobaktiini

transportsüsteemi reguleerimisel. Järgnevalt ongi kirjeldatud käesolevas töös uuritava *P. putida*'le sarnase *P. aeruginosa* kahekomponendilist süsteemi PfeS/PfeR raua omastamise seisukohalt.

Siderofoori transportsüsteem koosneb välismembraani TonB-st sõltuvast retseptorvalgust, Fe(III)-siderofooriga seonduvast periplasma valgust ja ABC-tüüpi transporterist, et viia kompleks üle tsütoplasamembraani (Noinaj jt., 2010). (1) Fe(III)-enterobaktiin seondub välismembraani retseptorile PfeA. Transport üle välismembraani periplasmaatilisse ruumi on energiast sõltuv. Kolmest valgust, TonB, ExbB ja ExbD koosnev Ton-kompleks saab energia tsütoplasamembraani prootonite liikumapanevat jõudust (edaspidi PMF), mille abil transpordib välismembraani retseptor enterobaktiini periplasmasse (Higgs jt., 1998; Larsen jt., 1994). (2) Fe(III)-siderofoor kompleksiga seondub periplasmaatiline valk, mis toimetab kompleksi tsütoplasamembraanil vastava ABC- tüüpi transporter juurde. (Noinaj jt., 2010) Seejuures on välismembraani retseptorite puhul täheldatud suuremat spetsiifilisust kui ABC-transporteritel, *P. aeruginosa* 35 välismembraani retseptori kohta tuleb ainult neli ABC-transporterit (Köster, 2001). (3) Tsütoplasmas Fe(III)-siderofoor kompleks redutseeritakse ja Fe(II) vabaneb, siderofoori madala afiinsuse tõttu redutseeritud raua suhtes. Siderofoori on võimalik taaskasutada (Imperi jt., 2009) (joonis 3). TonB-sõltuvaid retseptoreid ekspresseeritakse ainult vajadusel, sest mõned kolitsiinid või faagid võivad neid kasutada rakku pääsemiseks (Cascales jt., 2007).

PfeA on *P. aeruginosa* enterobaktiini-Fe(III) retseptor välismembraanil, mille ekspressioon on Fe(II) ionide olemasolul rakus repressseeritud ja indutseeritud siderofoori enterobaktiin olemasolu korral (Dean ja Poole, 1993a; Poole jt., 1990). PfeA raua sõltuvat ekspressiooni vahendab Fur-repressor, mis seondub *pfeA* geenist ülesvoolu olevale Fur konsensusjärjestusele (Fur box). Fur- box *pfeA* puhul on tcaAATaAcAATCAaTATC, milles suurtähedega on märgitud konsensussega kattuvaid positsioonid (Ochsner ja Vasil, 1996; Prince jt., 1993). Fur repressseerib *pfeA* transkriptsiooni olles seonduvad oma korepressori, kahevalentse raua iooniga (või Mn^{2+}) (Cornelis jt., 2009). Enterobaktiinist sõltuva *pfeA* ekspressiooni reguleeritakse geenide *pfeR/S* kaudu (Dean ja Poole, 1993b). PfeS-PfeR moodustavad kahekomponentse süsteemi, milles *pfeS* kodeerib histidiini sensor kinaasi ja *pfeR* vastuse regulaatorit (joonis 3) (Dean jt., 1996).

Rakkudes eksisteerib ka teine, madalama afiinsusega enterobaktiini omastamise süsteem, mis on samuti indutseeritud raudlimitatsiooni tingimustes, aga ei sõltu enterobaktiinist (Poole jt., 1990). Seda süsteemi vahendab PirA (PA0931) (Ghysels jt., 2005). Pseudomonas ortoloogide andmebaasi järgi on *P. aeruginosa* PAO1 *pirA* sarnasane *P. putida* KT2440-s PP_2242 (Winsor et al., 2016).



Joonis 3. Ksenosiderofoori enterobaktiin omastamine *Pseudomonas aeruginosa*-s. Joonis põhineb järgmistel töödel: (Andrews jt., 2003; Crosa, 1997; Krewulak ja Vogel, 2008). Fe(II)- enterobaktiin siseneb periplasmasse läbi Ton- kompleksi sõltuva retseptori PfeA või PirA. Periplasmaatilised valgud viivad kompleksi vastava ABC- transporterini ja kasutades ATP hüdrolüüsi energiat viiakse kompleks üle tsütoplasamembraani. Tsütoplasmas kompleks redutseeritakse, vabanenud siderofoori on võimalik uuest rakust välja sekreteerida. Enterobaktiin võib aktiveerida kahekomponendilise süsteemi PfeS/PfeR, mille aktiveerimise tagajärjel ekspresseeritakse enterobaktiini retseptorvalku PfeA. Üleliigne Fe(II) seondub Fur-iga, mis inhibeerib geenide *pfeA* ja *pfeR* transkriptsiooni seondudes promootori konsensusjärjestuste vahele.

1.3 Mittekodeerivad RNA-d ja ekskludoniga geeniekspressiooni reguleerimine

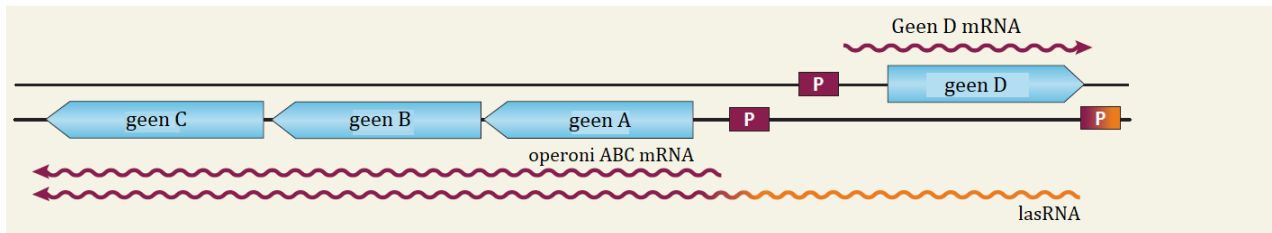
Mittekodeerivad RNA-d on olulised geeniekspressiooni reguleerijad kõigis eludomeenides. Prokarüootides on mittekodeerivate RNA-de osatähtsus genoomis ligi 1%, eukarüootides on see kordades suurem (Mattick, 2004).

Prokarüootide regulaatorseid RNA-sid saab jagada kolme gruppi. Esiteks *cis*-regulaatorsed RNA-d, mis asuvad reguleeritava mRNA 5' mittetransleeritavas järjestuses. Heaks näiteks on ribolülid ja RNA termomeetrid – RNA regulaatorse ala seondumisel efektoriga (metaboliit, metalli-ioon) toimuvad RNA-s konformatsioonilised muutused, mille tulemusena aktiveeritakse või repressseeritakse RNA translatsiooni (Sesto jt., 2013; Winkler ja Breaker, 2005). Teiseks *trans*-regulaatorsed väikesed mittekodeerivad RNA-d (sRNA), mis reguleerivad teisest genoomsest lookusest transkribeeritud mRNA-d. Selline sRNA seondub enamasti mRNA-l ribosoomi seondumisjärjestuse lähedale, kusjuures transkriptide paardumine on osaline (Sesto jt., 2013; Storz jt., 2011). Kolmandaks *trans*-toimelised *antisense* RNA-d (asRNA) – üheaahelaline RNA, mis on komplementaarne vastasahelalt kodeeritud geeniga või mittekodeeriva RNA-ga (Sesto, jt., 2013).

Ahelaspetsiifilise RNA-seq (*high throughput sequencing*) ja mikrokiip kasutuselevõtu järel on bakterite transkriptoomist leitud hulgaliselt asRNA transkripte (Cho ja Kim, 2015). *Pseudomonas syringae* transkriptoomi uurimisel leiti 124 geeni, millel täheldati nii kodeerivat kui *antisense* transkriptsioonilist aktiivsust (Filiatrault jt., 2010). *Antisense* RNA-d võivad mõjutada märklaudgeeni ekspressiooni mõjutades nii mRNA stabiilsust, translatsiooni kui transkriptsiooni läbi transkriptsiooni interferentsi või attenuatsiooni (Georg ja Hess, 2011).

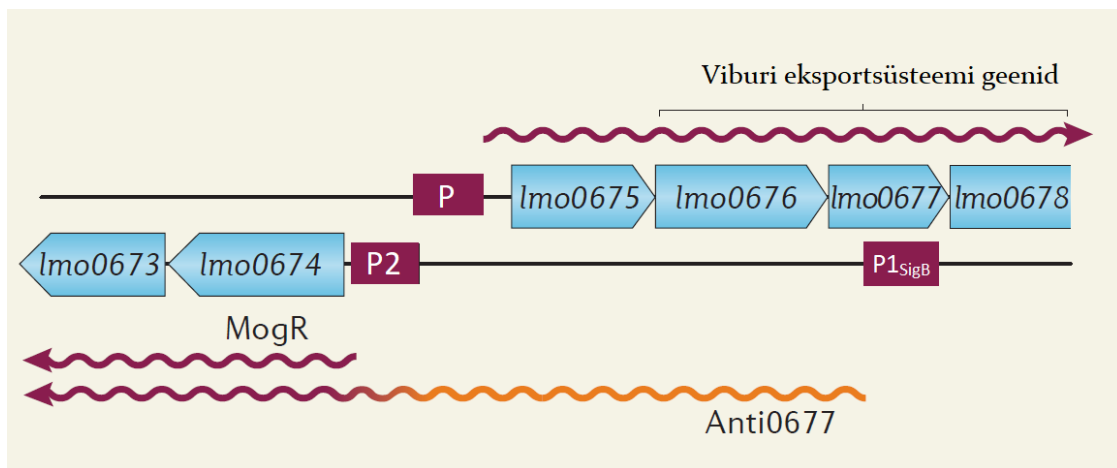
Gram-positiivsete bakterite *Listeria monocytogenes* ja *Listeria innocua* transkriptoomi uurimisel tuvastati varem kirjeldamata asRNA vahendatud geeniekspressiooni mehhanism, mis nimetati ekskludoniks (Toledo-Arana jt., 2009; Wurtzel jt., 2012). Ekskludon kujutab endast samast lookusest vastassuunaliselt transkribeeritud mRNA-sid, mis peale geeni kodeerimise käituvad teineteise suhtes asRNA-dena. Neid eristab tavalisest asRNA-st just geeni kodeerimine, sest tavaliselt asRNA-del on ainult regulaatorne roll. Ekskludoni korral ei pea olema kogu mRNA komplementaarne vastasahelalt transkribeeritud mRNAga, vahel on kattuv ainult mRNA-de 5'

osa. Nimelt, ekskludoni korral käitub mRNA transkripti pikk 5' UTR kui antisense, paardub vastasahelalt transkribeeritud geeni mRNAga ja inhibeerib selle translatsiooni. Samas, lasRNA (*long antisense RNA*) allavoolu olev järjestus funktsioneerib tavalise mRNA-na ja seda saab transleerida (Lebreton ja Cossart, 2016; Sesto jt., 2013; Stazic ja Voß, 2016; Wurtzel jt., 2012) (joonis 4).



Joonis 4. Ekskludon. Lillad ja oranžid lainelised jooned tähistavad vastavalt mRNA ja lasRNA transkripte. Sinised nooltega kastid viitavad valku kodeerivatele geenidele ja P on promootor. Pikal asRNA-l on kahetine funktsioon, proksimaalne osa (oranž) käitub kui *antisense* ja paardub vastasahelal oleva geeni *D*-ga inhibeerides viimase ekspressiooni. Samas distaalne osa (purpurne) sisaldab kõrvaloleva operoni ABC kodeerivat järjestust ning mõjutab operoni ekspressiooni positiivselt. (kohandatud Sesto jt., 2013)

Ekskludoni kirjeldati esimesena gram-positiivse bakteri *L. monocytogenes mogR* lookuses (Toledo-Arana jt., 2009). Valk MogR on bakteri liikumise ja viburi geenide transkriptsiooni repressor. Vastasahelal paiknev *fli*-operon (*Imo0675- Imo0676- Imo0677- Imo0678*) kodeerib viburi valkude eksportsüsteemi valke (FliP, FliQ, FliR). MogR-i seondumine *fli*-operoni promootorile represserib transkriptsiooni. Geenil *mogR* on kaks promootorit: P1 asub geenile lähedal startkoodonist 45 nukleotiidi ülesvoolu ja teine, sigmaB-st sõltuv, P2 asub 1697 nt geenist ülesvoolu. Lähemalt promootorilt, P1-lt, ekspresseeritakse mRNA-d pidevalt. Transkriptsioon teiselt promootorilt, P2-lt, annab ekskludonina käituvat transkripti Anti0677, mille proksimaalne osa on *antisense* geenidele *Imo0675- Imo0676- Imo0677* ja distaalne osa sisaldab *mogR*-i järjestust (joonis 5). Viburi sünteesi kontrollib seega nii Anti0677 antisense osa kui suurenenud MogR- i ekspressioon (Sesto jt., 2013; Toledo-Arana jt., 2009).



Joonis 5. Bakteri *Listeria monocytogenes* viburi biosünteesi ekskludon. Lilla joon tähistab mRNA transkriпти MogR ja oranž asRNA-d nimega Anti0677. ORF-id on kujutatud helesiniste nooltena, *mogR* promootorid on tähistatud *P1_{sigB}* ja *P2*. Viburivalkude transpordisüsteemi geenide *lmo0675*, *lmo0676* ja *lmo0677* ekspressiooni inhibeerib esiteks asRNA Anti0677, mida ekspresseeritakse promootorilt *P1*. Teiseks, suurenenud viburi ja liikuvus geenide repressori *mogR* ekspressioon, mille transkriptsioon algab *P2*-lt ning lisaks Anti 0677 3' (distaalne) osa, mis sisaldab *mogR*-i järjestust. (kohandatud joonis Sesto jt., 2013)

Listeria spp. on näidatud, et ekskludoniga kontrollitakse geenide ekspressiooni, millel on sarnane või vastandlik funktsioon. Näiteks ABC-tüüpi transporter*i* lasRNA inhibeerib MatE perekonda kuuluva antimikroobsete ainete eflukspumba geeni ekspressiooni (Wurtzel jt., 2012).

2. Eksperimentaalses

2.1 Töö eesmärk

GacS/GacA kahekomponentne signaalsüsteem on γ -proteobakterite hulgas laialt levinud ning väga oluline bakterite füsioloogia ulatuslikus ümberkorraldamises. Sellegipoolest ei ole geenide *gacS* ja *gacA* transkriptsiooni regulatsioonist palju teada. Kuna meie laboris uuritakse *P. putida* biofilmi moodustumist ning GacS/GacA signaalsüsteem on muuhulgas seotud ka biofilmi võtmefaktorite, valkude LapA ja LapF regulatsiooniga (Martínez-Gil, 2014; Martínez-Gil jt., 2010), siis nimetatud süsteemi geenide ekspressiooni esimesed etapid on olnud grupi huviorbiidis pikemat aega.

Minu bakalaureusetöö on osa suuremast projektist, mille käigus uuritakse *gacS*-i transkriptsiooni. Projekti hüpotees on järgmine: *gacS*-i transkriptsioon on reguleeritud ekskludoniga ning seetõttu tundlik vastasahela geeni ekspressioonile. Käesolev töö on projekti esimene etapp, mille eesmärgiks on tuvastada geeni *gacS* ja vastasahela geeni PP_1651 promootor(id).

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Töös kasutatud bakteritüved, nende kasvatamistingimused ja plasmiidid

Bakterit *Pseudomonas putida* Paw85 (Bayley jt., 1977) kasvatati Luria-Bertani (LB) söötmes, mis sisaldas 10 g/l NaCl, 5 g/l pärmiekstrakti ja 10 g/l trüptooni (Miller, 1992). Tardsöötme saamiseks lisati enne autoklaavimist agarit (15 g/l). Bakterirakke kasvatati temperatuuril 30°C, vedelsöötmes toimus kultuuri areerimine loksutil (180 pööret/min).

Plasmidi pBLKT selektsioonimarkerina lisati söötmesse kanamütsiini (Km, 50 µg/ml) ja sini-valge testi tegemiseks X-gal-i kontsentratsiooniga 40 µg/ml.

Kõik antud töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on ära toodud tabelis 1.

Tabel 1. Bakteritüved ja plasmiidid

| <i>Pseudomonas putida</i> tüvi | Kirjeldus | Allikas |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------|
| <i>P. putida</i> Paw85 | Metsiktüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud tüvega KT2440 | (Bayley jt., 1977) |

| Plasmiidid | Kirjeldus | Allikas |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| pBLKT' | Vektor, sisaldab promootorita reportergeeni <i>lacZ</i> , mille ees on transkriptsiooniterminaator T1T2, (Km ^R). Edaspidi pBLKT lühendina pB. | (Moor, 2011) |
| pB _{P_{gacS}} -P | pBLKT' vektoris 480 nt pikkune <i>gacS</i> promootorala lõik <i>lacZ</i> -geeni ees. Promootorala lõik amplifitseeritud oligonukleotiididega <i>gacSupup</i> ja <i>asgasSpr1</i> (Km ^r) | Konstrukt tegid R. Teras ja Heili Ilves. |
| pB- P _{gacS} -0 | Amplifitseeritud oligonukleotiididega <i>gacSdownBHI</i> ja <i>gacSupBamHI</i> 292 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | H. Ilves ja R. Teras |
| pB _{P_{gacS}} -1 | Amplifitseeritud oligonukleotiididega <i>gacSdownBHI</i> ja <i>gacSpr1BamHI</i> 245 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | H. Ilves, R. Teras |
| pB _{P_{gacS}} -2 | Amplifitseeritud oligonukleotiididega <i>gacSdownBHI</i> ja <i>gacSpr2BamHI</i> 196 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | H. Ilves, R. Teras |
| pB _{P_{gacS}} -3 | Amplifitseeritud oligonukleotiididega <i>gacSdownBHI</i> ja <i>gacSpr3BamHI</i> 145 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | H. Ilves, R. Teras |
| pB _{P_{gacS}} -4 | Amplifitseeritud oligonukleotiididega <i>gacSdownBHI</i> ja <i>gacSpr4BamHI</i> 95nt pikkune järjestus, (Km ^r) | H. Ilves, R. Teras |
| pB _{P_{gacS}} -5 | Amplifitseeritud oligonukleotiididega <i>gacSdownBHI</i> ja <i>gacSpr5</i> 38 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | H. Ilves, R. Teras |

| | | |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| pB_P _{gacS} -P1 | Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSupBamHI ja gacSdownfisdown2 254 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | R. Teras |
| pB_P _{gacS} -P1mut | Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSupBamHI ja asgacSP1-10 254 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | R. Teras |
| pB_P _{gacS} -P1-35 | Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSupBamHI ja asgacSP1-35 243 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | R. Teras |
| pB_P _{gacS} -P1-0 | Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSupBamHI ja asgacSP1-0 222 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | R. Teras |
| pB_P _{gacS} -3-3 | Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSupBamHI ja asgacSpr3BamHI 166 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | R. Teras |
| pB_P _{gacS} -3-2 | Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSupBamHI ja asgacSpr2BamHI 118 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | R. Teras |
| pB_P _{gacS} -P1-3-2mut | Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSupBamHI ja asgacSpr2mut 118 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | R. Teras |
| pB_P _{gacS} -3-1 | Amplifitseeritud oligonukleotiididega gacSupBamHI ja asgacSpr1 64 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | R. Teras |
| pB_P _{PP_1651} -1 | Oligonukleotiididega gacSpr2BamHI ja asgacSdown4BamHI amplifitseeritud 354 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | R. Teras |
| pB_P _{PP_1651} -RACE | Oligonukleotiididega gacSpr2BamHI ja gacSRACEBamHI amplifitseeritud 317 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | R. Teras |
| pB_P _{PP_1651} -2 | Oligonukleotiididega gacSpr2BamHI ja gacSdown3 amplifitseeritud 257 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | R. Teras |
| pB_P _{PP_1651} -3 | Oligonukleotiididega gacSpr2BamHI ja gacSdownBHI amplifitseeritud 196 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | R. Teras |
| pB_P _{PP_1651} -4 | Oligonukleotiididega gacSpr2BamHI ja gacSdownfisdown2 amplifitseeritud 158 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | R. Teras |

| | | |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| pB_PP_1651-5 | Oligonukleotiididega gacSpr2BamHI ja asgacS-P1-0 amplifitseeritud 126 nt pikkune järjestus. | Töö autor |
| pB_PP_1651-6 | Oligonukleotiididega gacSpr2BamHI ja asgacSpr3BamHI amplifitseeritud 70 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | Töö autor |
| pB_PP_1651-P | Oligonukleotiididega PP1651down2 ja PP1651down1 amplifitseeritud 339 nt pikkune järjestus, (Km ^r) | R. Teras |

Tabel 2. Töös kasutatud oligonukleotiidid

| Oligonukleotiid | Oligonukleotiidi järjestus 5'- 3' suunas* | Seondumiskoht |
|-----------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| gacSdownBHI | AAGGATCCGTATGTGCCTGGATGCCGTC | Positsioonid -13...-32 nt geenist <i>gacS</i> ülesvoolu -120...-139 nt allavoolu geenist PP_1651 |
| gacSupBamHI | AAGGATCCAGGTGACCTGGCAGCCGC | -285...-304 nt geenist <i>gacS</i> ülesvoolu +134...+153 nt geenist PP_1651 allavoolu |
| gacSpr1BamHI | AAGGATCCACCAAGCACCGGGTCGTC | -239...-257 nt geenist <i>gacS</i> ülesvoolu |
| gacSpr2BamHI | AAGGATCCAGATACAGGATTCATT-GGCAA | -188...-208 ülesvoolu geenist <i>gacS</i> +57...+37 nt ülesvoolu geenist PP_1651 |

| | | |
|------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| gacSpr3BamHI | AAGGATCCGAGCATTCGCCACCTGCC | -140...-157 nt geenist <i>gacS</i> ülesvoolu |
| gacSpr4BamHI | AAGGATCCCGGCGCATAACACGTACTA | -89...-107 nt geenist <i>gacS</i> ülesvoolu |
| gacSpr5BamHI | AAGGATCCGCTTGGCCGTTACCACTT-GAC | -30...-50 nt geenist <i>gacS</i> ülesvoolu |
| gacSdownfisdown2 | AAGGATCCGCGAAGTTACTCCGCCTG | -51...-69 nt geenist <i>gacS</i> ülesvoolu -83...-101 nt allavoolu geenist PP_1651 |
| asgacSP1-10 | AAGGATCCCGCG GCGTGG CTCCGCCT-GCCGCA | -51...-74 nt geenist <i>gacS</i> ülesvoolu Oletatav -10 box on ära mu-teeritud |
| asgacSP1-35 | AAGGATCCTCCGCCTGCCGCACCATTG | -62...-80 nt geenist <i>gacS</i> ülesvoolu Oletatav -10 box on välja lõi-gatud |
| asgacSP1-0 | AAGGATCCTCTCTTTAGTACGTGTTA | -83...-100 geenist <i>gacS</i> ülesvoolu. Nii -10 kui -35 box on ära lõigatud Positsioon -52...-69 nt gee-nist PP_1651 ülesvoolu |
| asgacSpr3BamHI | AAGGATCCTGGCAGGTGGCGAAT-GCTCAAT | -139...-160 ülesvoolu <i>gacS</i> -ist Positsioon +9...-13 nt PP_1651 suhtes |
| asgacSpr2BamHI | AAGGATCCGTTGCCAATGAATCCT-GTATCTATTTACAACACCAACATCCTTG | -187...-230 nt geenist <i>gacS</i> ülesvoolu |
| asgacSpr2mut | AAGGATCCGTTGCCAATGAATCCT-GTATC CCTCC ACAACACCAACATCCTTG | -187...-230 nt geenist <i>gacS</i> ülesvoolu |

| | | |
|------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------|
| | | Oletatav -10 konsensusjärjestus on muteeritud |
| asgacSpr1 | AAGGATCCCGACCCGGTGCTTGGTG | -241...-257 nt geenist <i>gacS</i> ülesvoolu |
| gacSupup | AAGGATCCTTGCGGTTGAGGATGTCC | -720...-703 nt geenist <i>gacS</i> ülesvoolu |
| asgacSdown4BamHI | AAGGATCCATCATCTTGCCGCGCTGC | -280...-297 nt allavoolu geenist PP_1651 |
| gacSRACEBamHI | AAGGATCCCGTTCTGTTGCAGCCAGG | -243...-260 nt allavoolu geenist PP_1651 |
| gacSdown3 | AAGGATCCGCGAGTGCCAGCAGCAGTACCCGG | -178...-200 nt allavoolu geenist PP_1651 |
| PP1651down2 | AAGGATCCCCTGCGCAACTGGAGAGAATTG | -368... -347 nt geeni PP_1651 suhtes |
| PP1651down1 | AAGGATCCGAGGATCAGCAACAG | -685...-671 nt allavoolu geenist PP_1651 |
| lacZseq | GGATGTGCTGCAAGGCG | 94...110 nt geen <i>lacZ</i> algusest ülesvoolu |

* BamHI lõikejärjestus on alla joonitud. Jämedas kirjas on muteeritud järjestus.

2.2.2 Promootorala-konstruktide kloneerimine transkriptsioonivektorisse pBLKT'

P. putida geenide *gacS* ja PP_1651 promootorala kloneerimiseks pBLKT' (Moor, 2011) amplifitseeriti PCR-ga vajalik piirkond, kasutades oligonukleotiide, mille 5' otsa oli disainitud restrikaasi BamHI lõikejärjestus (tabel 2). Konstruktide PgacS3-2mut ja PgacSP1mut, milles geeni *gacS* potentsiaalse promootori -10 element on muteeritud, tegemiseks kasutati nn veaga oligonukleotiidi, vastavalt asgacSpr2mut ja asgacS-P1-10, ning teise praimerina gacSupBHI. Nii PCR-i produkte kui vektorit pBLKT' lõigati BamHI-ga, järgides firma Thermo Scientific protokoll. Kloneerimise õnnestumist kontrolliti PCR-iga, kasutades pBLKT'-le seonduvat oligonukleotiidi

lacZseq ja sõltuvalt konstruktist kloneeritava fragmendi 5'-poolsele otsale istuvat oligonukleotiidi. Kõigi kloneeritud konstruktide järjestuse õigsust kontrolliti sekveneerimisega.

DNA-d lõigati restrikaasiga BamHI 20 µl reaktsioonilahuses, mis sisaldas 1-kordset Thermo Scientific FAST-puhvrit, ligikaudu 0,25 µg PCR produkti või 1 µg pBLKT', 5 U ensüümi FASTfBamHI. Vektori puhul lisati reaktsioonisegusse 1 U FAST-SAP (temperatuuri tundlik aluseline fosfataas, töötlus eemaldab fosfaatrühma DNA 5' otsast ja väldib DNA iseendaga kokku ligeerimist ehk hoiab DNA molekuli lineaarsena). Lõikamiseks inkubeeriti lahuseid 10 min temperatuuril 37 °C, seejärel ensüümide inaktiveerimiseks 10 min temperatuuril 80 °C ja vähemalt 1 minut temperatuuril -20 °C. Järgnes DNA sadestamine 2-3 mahu 96% etanooliga ja 1/10 mahu 5M NaCl-ga temperatuuril -20 °C. Seejärel DNA tsentrifuugiti põhja toatemperatuuril kasutades tsentrifugaaljõudu 11 337 g 5-10 minutit, DNAd pesti 75% etanooliga ning tsentrifuugimist korrati. Sade kuivatati termostaadis ja DNA lahustati 10 µl vees. Ligeerimiseks segati kokku 15 µl reaktsioonisegu, mis sisaldas ligikaudu 0,1 µg plasmidi (1/10 algsest kogusest), 0,125 µg fragmenti (1/2 algsest kogusest), Thermo Scientific 10X T4 DNA Ligase Buffer (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP), 1 mM ATP, 0,5 U ligaasi ja vett. Reaktsioonisegu jäeti üleöö toatemperatuurile ligeerima. Järgmisel päeval viidi ligaasisegu elektroporatsiooniga kompetentsetesse rakkudesse. Rakud plaaditi selektiivsele tardagarile ja kolooniaid kontrolliti PCR-iga.

2.2.3 PCR

PCR-i kasutati kloneerimiseks ning saadud konstruktide õigsuse kontrollimiseks. PCR-i reaktsioonisegu lõppmahuga 30 µl sisaldas: PCR-puhvrit (750 mM Tris-HCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Triton X-100), 0,2 mM dNTP, 3 µl MgCl₂, 10 pmol kumbagi praimerit, 0,15 U Taq polümeraasi, deioniseeritud vett vajaliku mahuni viimiseks ning bakterirakke. PCR viidi läbi firma Biometra või Eppendorf termotsükleriga.

PCR-programm koosnes 25 tsüklist, järgnevatel tingimustel: 45 sekundit 96 °C DNA vabanemiseks rakkudest ja DNA-ahelate lahtisulamiseks, 30- 60 sekundit temperatuuril 58 °C praimerite seondumiseks matriits-DNAle ja uue DNA sünteesiks 45-60 sekundit temperatuuril 72 °C, sõltuvalt matriitsahela pikkusest.

2.2.4 Plasmiidse DNA eraldamine ning geelelektroforees

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati firma Favorgen DNA eraldamise komplekti FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit. Plasmiidne DNA eraldati *P. putida* rakkudest vastavalt firma protokollile ning võeti üles 70 µl-s elueerimispuhvris.

DNA (PCR-produktid ja plasmiidne DNA) analüüsimiseks kanti DNA 1 või 2% agarosgeelile TAE puhvris (50 mM Trisatsetaat; 1mM EDTA, pH 8,2), mis sisaldas visualiseerimiseks etiidiumbromiidi (0,20 µg/ml). Kasutati firma ThermoFisher suurusmarkerit ZipRulerExpress 1 või 2 ja proovid voolutati pingel 5 V/cm. Geelile kantavale DNAle lisati 3 µl laadimispuhvrit (0,04% broomfenoolsinise lahus 50% glütseroolis). DNA visualiseeriti UV-laua, kasutades lainepikkust 302 nm.

2.2.5 DNA sekveneerimine

PCR-produktide nukleotiidses järjestuses kontrollimiseks sekveneeriti proovid kasutades firma Applied Biosystems sekveneerimiskomplekti BigDye Terminator v3.1. Reaktsioonisegu lõppmahuga 10 µl sisaldas: 1 µl PCR produkti, 0,7 µl premix-i, 2 µl 5x lahjenduspuhvrit (200 mM Tris pH 9,0; 6 mM MgCl₂), 1,6 pmol praimerit, reaktsioonisegu maht tõsteti deioniseeritud veega 10 µl-ni. Kasutati genoomika instituudi sekveneerimise tuumiklabori teenust Sanger-tüüpi sekveneerimiseks.

Sekveneerimisreaktsioon koosnes 30-st PCR tsüklist, tingimustel 15 sekundit 95 °C, 10 sekundit 56 °C ja 45 sekundit 60 °C. Reaktsioonisegu sadestati 2 µl dekstaani ja 30 µl 96% etanooliga, hoiti 10 minutit temperatuuril -20 °C. Pesti kaks korda 180 µl-i 75% etanooliga, peale mida supernatant eemaldati ja sademel lasti kuivada avatud tuubis 65 °C juures. Proov lahustati 10 µl formamiidis. Saadud sekvensi analüüsiti programmiga BioEdit 7.0.5.3.

2.2.6 Kompetentide valmistamine ja rakkude elektroporatsioon

Bakteri *Pseudomonas putida* Paw85 rakke kasvatati üleöö 5 ml-s LB-söötmes. Baktereid kasvatati termostaadis temperatuuril 30 °C ning pöõretel 180 rpm/min. 1,5 ml bakterikultuuri tsentrifuugiti 90 sekundit (11 337 g), supernatant eemaldati ja rakke pesti kolm korda 1 ml 300mM sahharoosi lahusega. Viimase tsentrifuugimise järel eemaldati supernatant ja resuspendeeriti rakud 0,5 ml-s 300 mM sahharoosi lahuses. Saadud kompetente kasutati kohe DNA sisseviimiseks elektroporeerimise abil.

Plasmiidse DNA rakkudesse viimiseks kasutati elektroporatsiooni, mis teostati firma Biorad elektroporaatoriga *E. coli* Pulser. Segati kokku 70 µl kompetentseid rakke ja 20 ng plasmiidset DNA-d, segu pipeteeriti küveti ja elektroporatsioon teostati pingel 2500V. Küvetist välja pestud rakke kasvatati 1,5 ml-s LB söötmes loksutil temperatuuril 30 °C 30-60 minutit. Seejärel rakud kontsentreeriti tsentrifuugimisega ja plaaditi LB- tardsöötmele, millele oli lisatud Km ja X-gal-i (0,1 µg/ml) .

2.2.7 β-galaktosidaasi eriaktiivsuse määramine

Funktsionaalse promootori kindlakstegemiseks kloneeriti *gacS*-i või PP_1651 natiivne või mutatsioonidega promootorala pBLKT' reportergeeni *lacZ* ette (tabel 6-8) β-galaktosidaasi eriaktiivsuse määramiseks kasutati Milleri meetodikat (Miller, 1972). Rakke kasvatati 5 ml LB-s, vastava antibiootikumi juuresolekul loksutil temperatuuril 30 °C 18 tundi. 20 µl rakke lisati 800 µl reaktsioonisegule, mis sisaldas 60 mM Na₂HPO₄, 35 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 28 mM β-merkaptopetanol, 50 µl kloroformi pH-l 7. Reaktsioon käivitati substraadi, 200 µl ONPG (orto-nitrofenüül-β-Dgalaktopüranosiid, 4 mg/ml) lisamisega. Piisava kollase värvuse moodustumisel peatati reaktsioon 500 µl 1M Na₂CO₃ lisamisega ning fikseeriti reaktsiooni aeg. Seejärel mõõdeti orto-nitrofenooli neeldumine 420 nm juures ja lüüsunud rakkude optiline

tihedus lainepikkusel 550 nm. β -galaktosidaasi eriaktiivsust (E) väljendati Milleri ühikutes (MÜ) ja arvutati valemiga:

$$E = 1000 \times \frac{OD_{420} - 1,75 \times OD_{550}}{t \times V \times OD_{580}}$$

kus OD420 ja OD550 tähistavad vastavalt reaktsioonisegu optilist tihedust lainepikkusel 420 nm ja 550 nm. OD580 tähistab lainepikkusel 580 nm mõõdetud bakterikultuuri tihedust, t on reaktsiooniaeg minutites ja V on reaktsioonisegusse lisatud bakterikultuuri maht milliliitrites.

2.2.8 Statistiline analüüs

Statistilise analüüsi jaoks kasutati tarkvara Statistica 13. versiooni. Andmete analüüsimiseks kasutati multifaktoriaalset ANOVA-t ning Bonferoni järeltesti olulisusnivooga 0,05. Joonistel toodud homogeensusrühmad näitavad andmerühmade sarnasust – sama tähe korral on rühmade p-väärtus üle 0,05 ning rühmad on statistilise analüüsi järgi sarnased. Homogeensusrühmade arvutamiseks võeti väärtustest kümnendlogaritm. Selle töö joonistel on näidatud tulemuste aritmeetilised keskmised koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusrühmadega. Homogeensusrühmade sarnased tähed märgivad statistiliselt mitteolulisi erinevusi ($p > 0,05$) keskmiste väärtuste vahel.

2.3 Tulemused

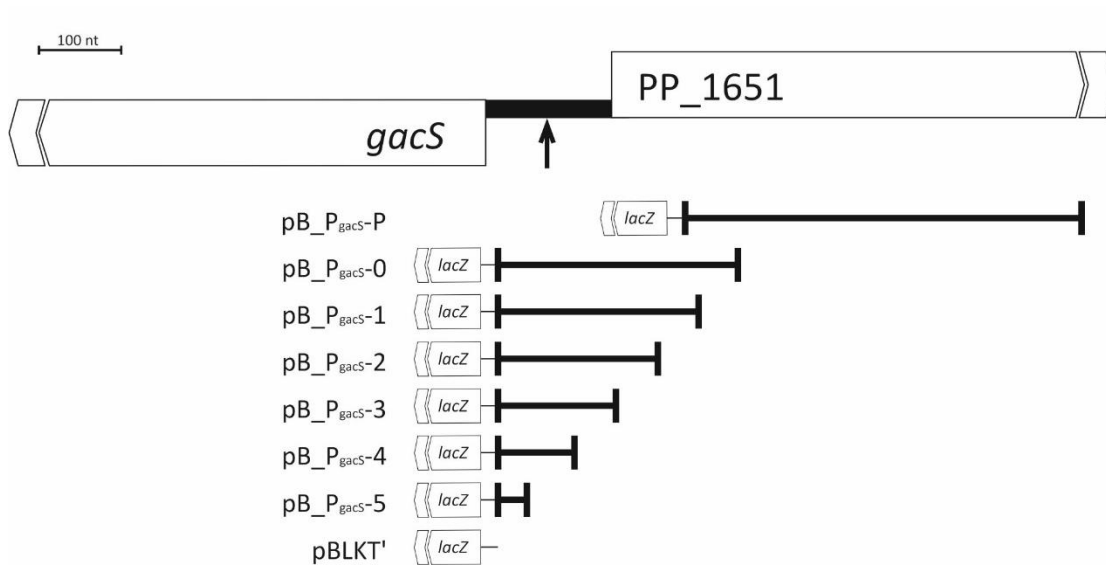
2.3.1 Geeni *gacS* promootorala lühendamine 5' otsast

Eelnevalt on grupis RACE-ga (*rapid amplification of cDNA ends*) näidatud, et *gacS* mRNA 5' ots asub 50 nukleotiidi geenist ülesvoolu, kuid sekveneerimissignaali halva kvaliteedi tõttu loeti saadud tulemus ebausaldusväärseks (R. Teras avaldamata andmed). Arvatavasti oli sekveneerimissignaalis olev tugev müra tingitud *gacS*-i geeni alguse ja promootorala G/C-rikkusest ja/või mRNA sekundaarstruktuuridest, mis takistavad RACE-ks vajaliku cDNA sünteesi ja järgnevate PCR-de toimumist.

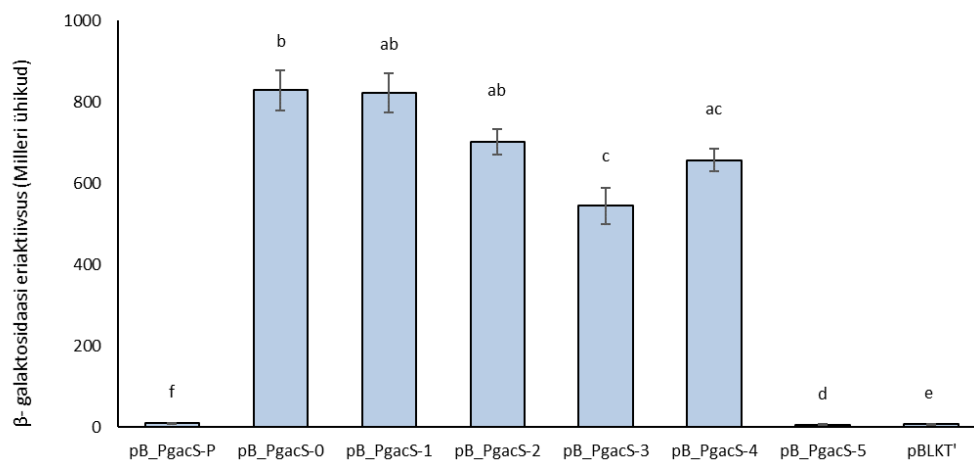
Käesolevas töös konstrueeriti promootorite leidmiseks 304 nt pikkuse *gacS*-i promootorala variandid pB_P_{gacS}-0 kuni pB_P_{gacS}-5, kus promootorala 3' ots oli kõigil sama, kuid 5' ots erinev (joonis 6). Promootorala 5' otsa lühendamisel peaks tekkima olukord, kus promootori väljalõikamisel või katkestamisel reportergeeni *lacZ* enam *P. putida*'s ei ekspresseerita ning β -galaktosidaasi eriaktiivsus langeb rakkudes nn tühja vektori pBLKT' LacZ eriaktiivsuse tasemini. *P. putida*'s LacZ eriaktiivsuse baasväärtuse leidmiseks mõõdeti β -galaktosidaasi eriaktiivsust rakkudest, millesse oli elektroporeeritud plasmiid pBLKT', mis ei sisaldanud reportergeeni ees kloneeritavaid promootorjärjestusi (joonis 6).

P. putida-sse poreeritud plasmiidide pB_P_{gacS}-1 kuni pB_P_{gacS}-4 korral oli LacZ-i eriaktiivsuse väärtused sarnased, kõikides ligikaudu 600- 800 MÜ vahel (joonis 6, tabel b). Kuid pB_P_{gacS}-5 (*lacZ* geeni ees *gacS* promootoralast 38 nukleotiidi pikk konstrukt) (joonis 6) juures langes β -galaktosidaasi eriaktiivsus 5,1 MÜ-ni (joonis 6, tabel b), mis on võrreldav nn tühja vektori pBLKT' tagatud eriaktiivsusega. Konstrukti pB_P_{gacS}-4, mis on 57 nukleotiidi pB_P_{gacS}-5-st pikem, korral taastub β -galaktosidaasi eriaktiivsus. Kuna pB_P_{gacS}-5-st 57 nt pikemal pB_P_{gacS}-4-l mõõdeti β -galaktosidaasi eriaktiivsus ja lühema konstruktil mitte, siis annab see alust arvata, et selles piirkonnas võib olla promootor või osa promootorist, edaspidi tähistatud kui P1_{gacS}.

(a)



(b)



Joonis 6. (a) geeni *gacS* promootorala konstruktide kaart. Valge kastiga on tähistatud geenid *gacS* ja PP_1651. Musta noolega on näidatud eelnevalt RACE-iga määratud *gacS*-i mRNA 5' ots (R. Terase avaldamata andmed). Iga konstrukti puhul on näidatud 5' otsast lühendatud *gacS*-i promootorala musta joonega, mille 3' otsas on reportergeen *lacZ*. (b) *Pseudomonas putida* Paw85-e β -galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtused, mõõdetud LB söötmes. Rakud sisaldasid plasmide: pB_P_{gacS}-0-5, pB_P_{gacS}-P ja pBLKT'. Esitatud on vähemalt nelja bioloogilise katse keskväärtsused (viie paralleeliga) koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusgruppidega.

Kontrollimaks olemasolevate konstruktidena määratud promootoralast ülesvoolu ei ole veel mõnda promootorit tehti pB_{P_{gacS}-P}, mis paikneb positsioonis -241...-720 nt geeni *gacS* algusest. β -galaktosidaasi eriaktiivsus langes pB_{P_{gacS}-P} korral 9,5 MÜ, mis võrreldes tühja plasmiidiga viitab funktsionaalse promootori puudumisele (joonis 6, tabel b).

2.3.2 Potentsiaalse promootori -10 elemendi muteerumine ja geeni *gacS* promootorala lühendamine 3' otsast

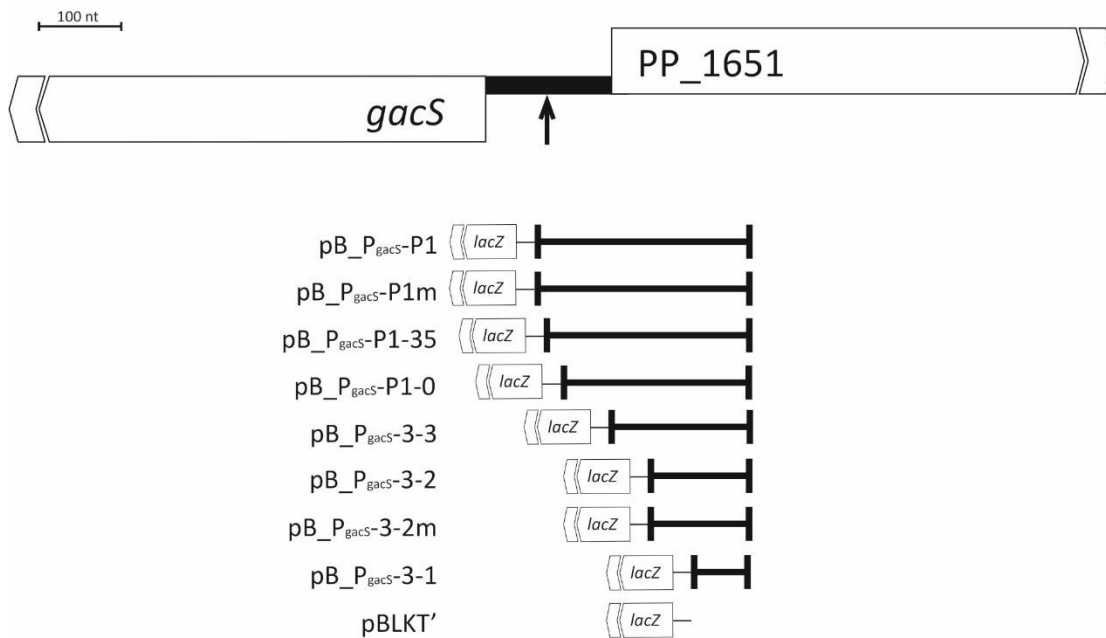
Konstrukt pB_{P_{gacS}-P1} sisaldab nagu pB_{P_{gacS}-0} kuni pB_{P_{gacS}-4} oletatavat promootorit P1_{gacS}, kuid on saadud lühendades promootorala 3' otsast (joonis 7). Promootori positsiooni tõestamiseks järgnes oletatava promootori (P1_{gacS}) -10 elemendi muteerimine (ATTGAA→GCGTGG), see andis konstrukti pB_{P_{gacS}-P1mut}, mille eriaktiivsuseks mõõdeti 57 MÜ, mis võrreldes pB_{P_{gacS}-P1} küll alandas LacZ eriaktiivsust rakkudes, kuid ei ole võrreldav tühja plasmiidiga puhul saadava LacZ eriaktiivsusega (joonis 7, tabel b). Katsest järeldati, et eriaktiivsus on kas artefakt või on kuskil veel nõrk promootor.

Tulemust kinnitavad pB_{P_{gacS}-P1-35} ja pB_{P_{gacS}-P1-0} LacZ- eriaktiivsuse väärtused. Neist esimesel on ainult oletatav -10 konsensus välja lõigatud ja teisel kogu oletatav promootor. Saadud väärtused, 38 MÜ ja 60 MÜ on võrreldavad pB_{P_{gacS}-P1-mut} väärtusega (joonis 7, tabel b).

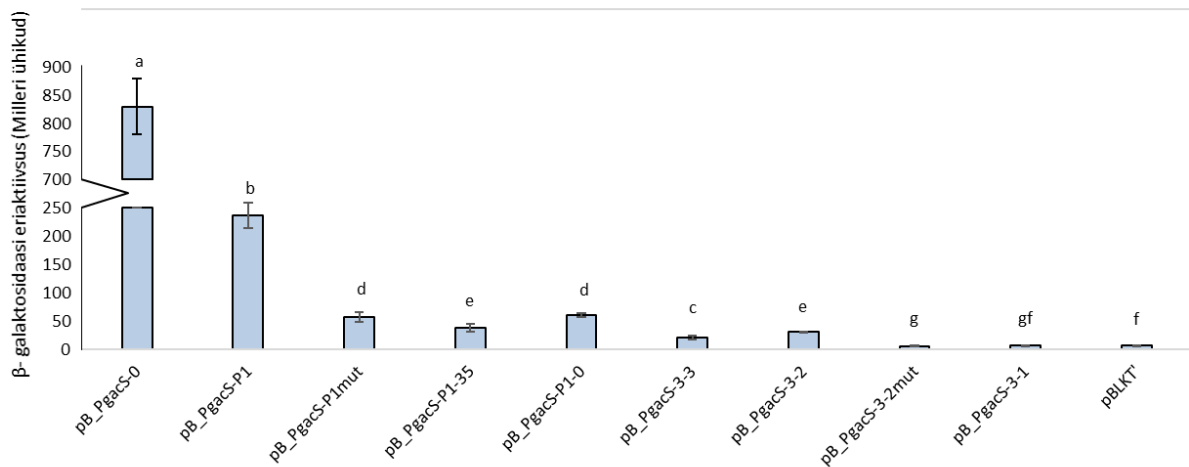
Leitud promootor P1_{gacS} võib varjutada teise võimaliku promootori aktiivsuse, mistõttu 5' otsa lühendamine selget eriaktiivsuse langust näha ei olnud.

Teise võimaliku promootori kontrollimiseks otsustati promootorala lühendada 3' otsast ja saadi konstruktid pB_{P_{gacS}-3-3}, pB_{P_{gacS}-3-2} ja pB_{P_{gacS}-3-1}, millel kõigil puudub P1_{gacS} promootor (joonis 7). Konstruktil pB_{P_{gacS}-3-2} mõõdeti β -galaktosidaasi eriaktiivsuseks 30 MÜ ja 54 nt lühema puhul pB_{P_{gacS}-3-1} 6 MÜ, järsk eriaktiivsuse langus viitab, et nimetatud 54 nt alas võib paikneda promootor või osa promootorist, edaspidi märgitud kui (P2_{gacS}) (joonis 7). Visuaalsel hindamisel leiti nimetatud alas võimalik -10 element (TAAATA). Seejärel muteeriti promootori kontrollimiseks oletatava -10 konsensus (TAAATA→CCTCC) ning saadud konstruktilt pB_{P_{gacS}-3-2mut} tagatud β -galaktosidaasi eriaktiivsuse mõõtmine. Saadud väärtus 5 MÜ on võrreldav tühja promootoriga, seega tegu oli funktsionaalse promootoriga (joonis 7, tabel b).

(a)



(b)



Joonis 7. Geeni (a) geeni *gacS* promootorala konstruktide kaart. Valge kastiga on tähistatud geenid *gacS* ja PP_1651. Musta joonega on kujutatud 3' otsast lühendatud promootorala konstruktid, mille ette on kloonitud reportergeen *lacZ*. (b) *gacS* promootorala 3' otsa lühendamisel saadud konstruktide β -galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtused mõõdetuna LB- söötmes kasvatud *P. putida* Paw85 rakkudes. Rakud sisaldasid plasmide: pB_P_{gacS}-0, pB_P_{gacS}-P1/P1mut/P1-35/P1-0, pB_P_{gacS}-3-3/3-2/3-2mut/3-1 ja pBLKT'. Esitatud on vähemalt kolme bioloogilise katse keskvaartused (viie paralleeliga) koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusgruppidega.

2.3.3 Geeni PP_1651 promootorite tuvastamine

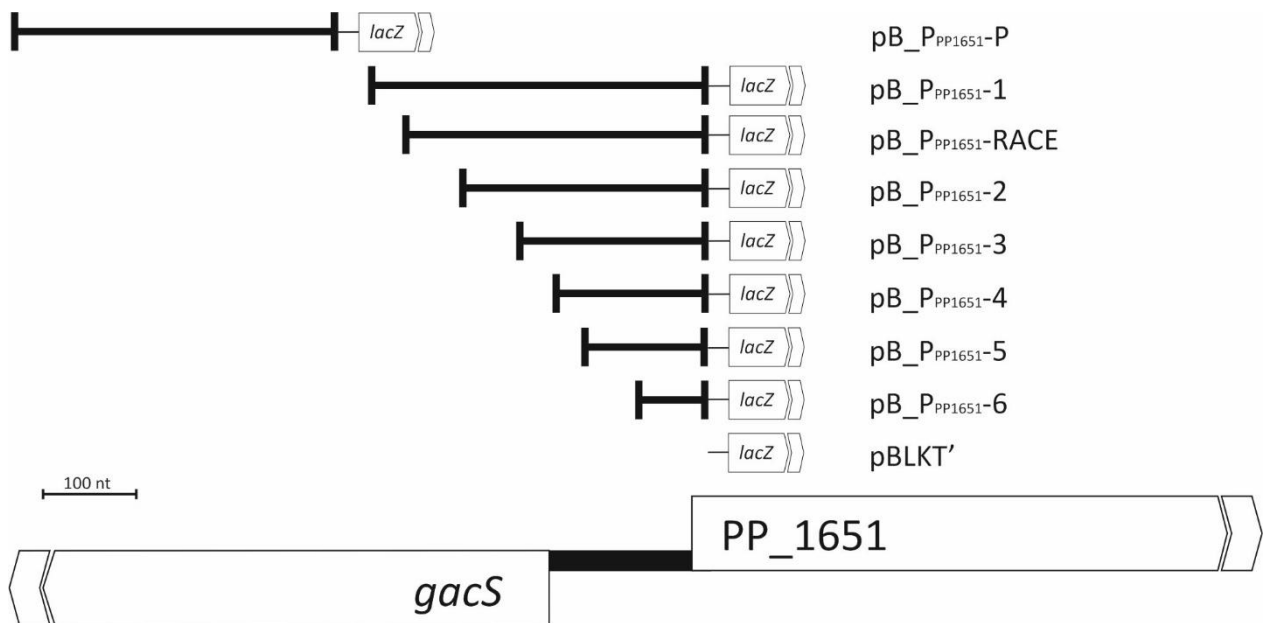
Geeni PP_1651 promootori(te) leidmiseks konstrueeriti 354 nt pikkuse promootorala variandidid pB_PP1651-1-6/RACE, kus promootorala 3' ots oli kõigil sama, kuid 5' ots erinev (joonis 8). Järgenevalt saadud konstruktid poreeriti ja mõõdeti β -galaktosidaasi eriaktiivsus (joonis 8, tabel b). Promootorala 5' otsa lühendamisel peaks tekkima olukord, kus promootori väljalõikamisel või katkestamisel reportergeeni *lacZ* enam *P. putida*'s ei ekspresseerita ning β -galaktosidaasi eriaktiivsus langeb rakkudes nn tühja vektori pBLKT' LacZ eriaktiivsuse tasemini.

Konstruktide pB_PP1651-1, pB_PP1651-RACE ja pB_PP1651-2 puhul on LacZ-i eriaktiivsuse väärtused sarnased, väärtuste varieerumine on statistiliselt ebaoluline (joonis 8, tabel b). Kui mõõdeti pB_PP1651-3, langes β -galaktosidaasi väärtus peaaegu kaks korda, 155 MÜ-lt 86- MÜ. Teist järsku β -galaktosidaasi väärtuse langust täheldati pB_PP1651-5 ja pB_PP1651-6 vahel, 76-lt MÜ 3 MÜ-ni.

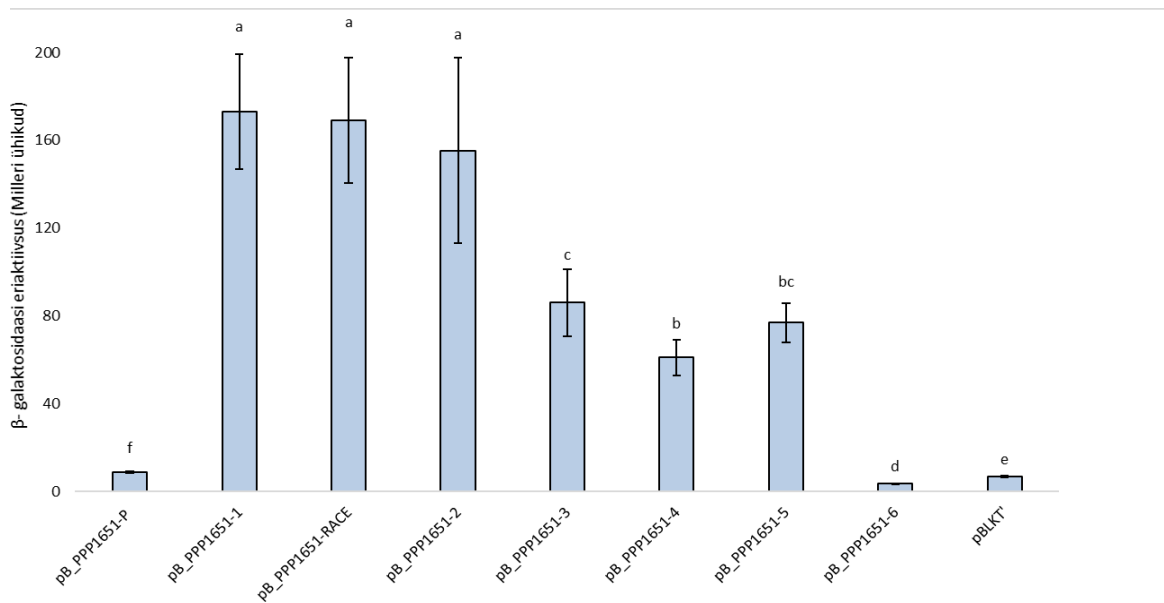
Kuna pB_PP1651-2 on ainult 61 nt pikem kui pB_PP1651-3 ning pB_PP1651-5 45 nt pikem pB_PP1651-6-st ja kummagi pikem konstruktt tagab β -galaktosidaasi eriaktiivsuse, aga lühem versioon mitte, siis järelikult on nendes piirkondades promootorid või osa promootoritest. Seega tuvastati PP_1651-l kaks piirkonda, kus võiks olla potentsiaalset promootorid, edaspidi tähistatud kui P2_{PP_1651} ja P1_{PP_1651}.

Kontrollimaks ega 354 nt promootoralt ülesvoolu ei ole peale kahe leitud promootori veel mõnda promootorit, konstrueeriti pB_PP1651-P (joonis 8), mis tagas *P. putida* rakkudes väga madala β -galaktosidaasi eriaktiivsuse 8,8 MÜ, mis on võrreldav pBLKT' väärtusega 6,8 MÜ. Sellest johtuvalt võib eeldada, et uuritud piirkonnas lisapromootoreid pole.

(a)

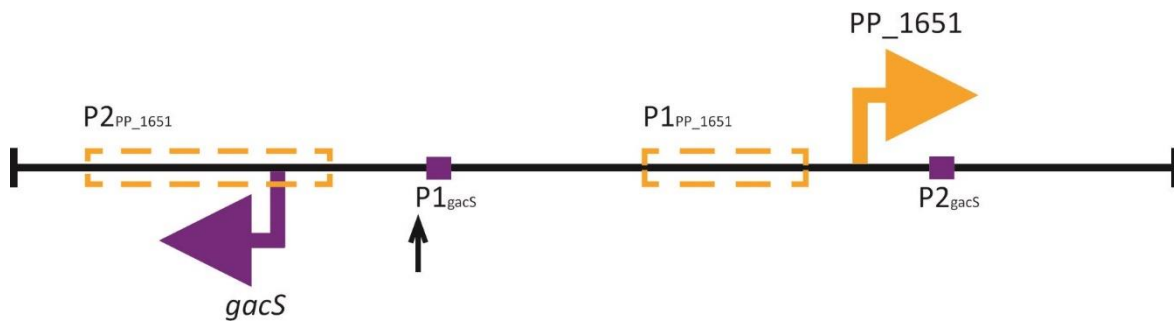


(b)



Joonis 8. (a) Geeni PP_1651 promootorala konstruktide kaart. Valge kastiga on tähistatud geenid *gacS* ja PP_1651. Musta joonega on tähistatud geeni PP_1651 promootorala. (b) LB- söötmes kasvanud *P. putida* Paw85 rakkude β - galaktosidaasi eriaktiivsuse väärtused. Rakud sisaldasid plasmide pBLKT', pB_PP1651-P, pB-PP1651-1-6 ja pBLKT'. Esitatud on viie paraleeliga katse tulemused koos 95% usalduspiiridega ja homogeensusgruppidega.

Kokkuvõtvalt, geenile *gacS* leiti promootorala lühendamisel kaks promotoorit, mille olemasolu kontrolliti ja kinnitati -10 konsensuse muteerumisega. Geenil PP_1651 tuvastati kaks potentsiaalset promotoorit (joonis 9).



Joonis 9. Geenide *gacS* ja PP_1651 promootorala skeem. Lilla ja oranži noolega on tähistatud vastavalt geenid *gacS* ja PP_1651. Must nool tähistab RACE-iga määratud mRNA 5' otsa. Lillad kastid tähistavad *gacS*-i promootorite -10 konsensusjärjestusi. Katkendjoonega oranžid kastid tähistavad PP_1651-e potentsiaalsete promootorite piirkondi.

2.4 Arutelu

Ellujäämiseks ning kasvamiseks on bakteritel vaja oma metabolismi kujundada keskkonnatingimustele vastavaks. Geenide ekspressiooni muutmine on küll suhteliselt aeglane ja energiakulukas, kuid siiski vajalik mehhanism, mida bakterid selle tarbeks kasutavad. Geeniekspressiooni muutmist vahendavad kahekomponendilised süsteemid, mille sensorinaas võtab vastu keskkonnast või raku seest tuleva stiimuli ja läbi vastuse regulaatori mõjutavad geenide ekspressiooni, mis võimaldavad suurendada nende ökoloogilist kohasust (Stock jt., 2000).

Bakteritel on äärmiselt oluline valida kahe vastandliku eluviisi vahel – paikse ehk biofilmi ja liikuva ehk planktilise. Keskkonnatingimuste muutumisel on oluline otsustada, kas jätkata elu bakterite ekstratsellulaarse maatriksiga kaetud kogumis ehk biofilmis või lahkuda biofilmist, leidmaks eluks paremaid keskkonnatingimusi.

Gamma-proteobakterid kasutavad eluviisi regulatsiooniks GacS/GacA kahekomponendilist signaalrada (Brencic jt., 2009; Verstraeten jt., 2008). Näiteks *P. fluorescens* F113-l represserib Gac-süsteem liikuvust ning mutanttüvedel on võrreldes metsiktüvega eelis risosfääri koloniseerimises (Martínez-Granero jt., 2006). Sellest lähtuvalt on meie laboris suurt tähelepanu pööranud *gacS*-i ekspressiooni uurimisele risosfääri bakteris *P. putida's*, mis on võimeline läbi taimejuurte koloniseerimise soodustama taimede kasvu. Geeni transkriptsiooni uurimiseks on vajalik teada, kus asub geeni promootor. Kuigi GacS/GacA signaalrada on *Pseudomonas*'tes pikka aega tähelepanu all olnud ja signaali ülekande põhjalikult uuritud, pole seniajani kirjeldatud *gacS*-i promootorit. Meie laboris on eelnevalt määratud RACE-meetodil *gacS*-i mRNA 5' ots, mis asub 50 nt geenist ülesvoolu. Kuid seda on seniajani peetud vähe usaldusväärseks ebarahuldava signaali kvaliteedi pärast, tõenäoliselt tingitud G/C-rikkuse pärast geeni alguses või võimalike sekundaarstruktuuridele geenist ülesvoolu (R. Terasse avaldamata andmed).

Uurimaks *gacS*-i ekspressiooni regulatsiooni sai selle töö esmaseks eesmärgiks tuvastada geeni *gacS* promootor(id) kasutades promootorala lühendamist 5' ja 3' otsast ning reportergeeni *lacZ* aktiivsuse mõõtmist. Hiljem lisandus PP_1651 promootorite kindlaksmääramine, sest ekskludoni uurimiseks on oluline määrata ka vastasahelalt kodeeritava geeni promootorid.

Geenile *gacS* leiti kaks promootorit, mille funktsionaalsus sai kinnitust oletatavate promootorite -10 elementide muteerumisega. Promootori P1_{gacS} -10 järjestus asub geenist -55...-60 nt ülesvoolu (joonis 9). Saadud tulemus vastab täpselt varasemalt RACE-ga leitud piirkonnale, kus *gacS*-i mRNA 5' otsast -50 bp (R. Terasse avaldamata andmed), millest 5 nukleotiidi ülesvoolu asub P1_{gacS} -10 heksameer. Üllatuslikult leiti promootorala lühendamisel leiti veel teinegi *gacS*-i promootor, P2_{gacS}, mille -10 järjestus asub geenist 209...213 nt ülesvoolu (joonis 9). Kahe promootori olemasolu pole ebatavaline, kuna kaks promootorit annab bakterile rohkem võimalusi geeniekspressiooni regulatsiooniks, näiteks *lapA* geenil on kirjeldatud *P. putida*'s kuus promootorit (Ainelo jt., 2017). Teise promootori olemasolu on oluline ekskludoni korral, kus ühelt promootorilt transkribeeritud mRNA võidakse vastasahela RNA-ga vaigistada, samas kui teiselt promootorilt seda ei pruugi juhtuda. Ekskludon kirjeldab geneetilist lookust, mille kahetise funktsiooniga mRNA kodeerib ühte geeni ja samas inaktiveerib teise vastasahelal vastasuunalise geeni või operoni ekspressiooni nagu tavaline asRNA (Sesto jt., 2013; Toledo-Arana jt., 2009).

Geeni *gacS* vastasgeeni PP_1651-ga selles töös promootorite täpset asukohta kindlaks määrata ei jõutud, kuid suudeti kindlaks teha kaks piirkonda, kus PP_1651-e promootorid võivad asuda. Vahemikus -138...-200 nt (võimalik P2_{PP_1651}) ja -14...-56 nt (võimalik P1_{PP_1651}) geeni PP_1651 algusest võiks olla geeni promootorid (joonis 9). Seega on ka PP_1651-l potentsiaalselt kaks promootorit.

PP_1651 moodustab koos PP_1652-ga operoni, mis tõenäoliselt kodeerivad vastavalt PfeR-II ja PfeS-II, kahekomponendilist süsteemi, mis on sarnane *P. aeruginosa* PfeR-i ja PfeS-ga (identsusprotsent 54,27% ja 52,6%) (Winsor jt., 2016). *P. aeruginosa* vastuse regulaator PfeR aktiveerib siderofoori enterobaktiin retseptori PfeA ekspressiooni, PfeS on sensor, mis tunnetab keskkonnas enterobaktiini olemasolu (Dean jt., 1996; Dean ja Poole, 1993; Winsor jt., 2016).

Risosfääris on kättesaadava Fe kontsentratsioon tihti madal, sest aeroobsetes tingimustes, neutraalsel või aluselisel pH-l on raud lahustumatu raudoksiidina (Colombo jt., 2013). Lisaks toimub risosfääris raua, kui olulise kofaktori, pärast bakteritevaheline konkurents (Hibbing jt., 2010). Raua on pseudomonaste füsioloogiale suur mõju, näiteks on teada, et raua limiteeritud söötmes moodustab *P. aeruginosa* õhukese ja lameda biofilmi (Banin jt., 2005; Patriquin jt., 2008; Singh jt., 2002). Rauavaegusel on mõju ka planktiliste rakkude kasvule, kuid see avaldub

madalamatel raua kontsentratsioonidel kui biofilmi korral (Patriquin jt., 2008). Rauanäljast ülesaamiseks toodavad bakterid rauda kelaativaid siderofoore, näiteks KT2440 puhul püoverdiini (Meyer, 2000). Ühtlasi on bakterid võimelised omastama ka teiste bakterite toodetud siderofoore, näiteks *P. putida* N1R võib omastada enterobaktiini (Loper ja Henkels, 1999).

Seega tekib küsimus, mida võiks looduslikes kooslustes esinev madal Fe kontsentratsioon juurte ümbruses tähendada geenidele *gacS* ja PP_1651, kui viimased oleksid reguleeritud ekskludoniga. Rauanäljas ja enterobaktiini olemasolul oleks PP_1651 aktiveeritud ning ühelt promootorilt transkribeeritava mRNA käituks antisensina, paarduks vastasahela geeni *gacS*-i RNA-ga ja seeläbi inhibeeriks ekspressiooni. Seega rauanäljas oleks GacS/GacA süsteem inaktiveeritud ja tõenäoliselt puuduks GacS-i biofilmi soodustav efekt. Tuleb siiski tõdeda, et selline regulatsioon on ainult üks paljudest variantidest, mida tuleks kontrollida, et paremini mõista GacS/GacA signaalirada, mis on oluline bakterite füsioloogia ümberkujundaja ja mõjutab tugevasti otsust paikse või planktilise eluviisi kasuks.

Tõestamaks, et geenide *gacS* ja PP_1651 ekspressioon toimub ekskludoniga on vaja teha lisakatseid, mille abil saaks võrrelda transkriptsioon ja translatsiooni erinevust. Kontrollida tuleks, kas ühe geeni promootorite topeltmutant mõjutab teise geeni ekspressiooni. Kui tegu on ekskludoniga, siis natiivsel promootoralal oleks RNA-valgu tasakaal kallutatud RNA poole. Katseid tuleks korrata nii rauavaeses kui rikkas rauarikka söötmes ja mõõta promootorite aktiivsust peale stratsionaarse veel ka eksponentsiaalses kasvufaasis.

Nende kahe geeni ekspressiooni uurimisele lisab keerukust transkriptsiooniregulaatorite võimalik mõju ekspressioonile. Kui regulaatori ekspressioon on kasvufaasist reguleeritud, näiteks Fis valku ekspresseeritakse kõige rohkem eksponentsiaalses kasvufaasis (Ball jt., 1992), siis võib muutuda tasakaal ühe või teise geeni ekspressiooni kasuks, olenevalt sellest, kuidas regulaator geenide transkriptsiooni reguleerib. Vähemalt praegu on teada, et *P. putida*'s seondub Fis *gacS*-i, seega ka PP_1651, promootoralale *in vitro* (Lahesaare, 2011).

Lõpetuseks võib lisada, et käesolev töö on üks osa suuremast projektist ning kahtlemata tasub jätkata uurimustööd lähtuvalt ekskludoniga ekspressiooni regulatsiooni võimalikkusest. GacS/GacA signaalirajal on bakterite füsioloogiale väga suur mõju ning *gacS*-i ekspressiooni esimeste etappide regulatsioon annaks aimu mitte ainult *P. putida* füsioloogia kujunemisest keerukates keskkonnatingimustes, vaid ka *P. putida*'le lähedase patogeense liigi *P. aeruginosa* füsioloogia regulatsioonist, kus bakter kasutab GacS/GacA signaalirada kroonilise ja akuutse infektsiooni regulatsiooniks.

Kokkuvõte

Teadagi on, et GacS/GacA on gamma-proteobakteritel oluline signaalirada, mis kontrollib sekundaarsete metaboliitide ja ekstratsellulaarsete ensüümide tootmist ja läbi nende reguleerib biofilmi moodustamist, liikumist, virulentsust ja biokontrolli võimet. Meie labori varasemate katsete põhjal on teada, et sensorkinaasi *gacS* geeni transkriptsiooni võib mõjutada globaalne regulaator Fis seondes *gacS*-i promootoralale. Geeni *gacS* transkriptsiooni regulatsiooni edasiseks uurimiseks on vaja teada geeni promootoreid ja seega sai käesoleva töö esimeseks eesmärgiks tuvastada geeni *gacS* promootor(id). Uurimaks, kas *gacS*-i ekspressioon on reguleeritud ekskludoniga alustati ka geeni PP_1651 promootorite leidmist.

Töö tulemused on järgmised:

- Geenil *gacS* tuvastati kaks promootorit. Esiteks P1_{*gacS*}, mille -10 element asub geenist -55...-60 nt ülesvoolu, saadud tulemus on kooskõlas varasemalt RACE-iga leitud mRNA 5' otsaga. P2_{*gacS*}, mille -10 element asub geenist -209...-213 nt ülesvoolu.
- Geenil PP_1651 määrati kindlaks kaks piirkonda, mis potentsiaalselt sisaldavad promootorit. Võimalik P2_{PP_1651} asub vahemikus -138...-200 nt ja võimalik P1_{PP_1651} -14...-56 nt geenist ülesvoolu.

Summary

Promoters of genes *gacS* and PP_1651 in *Pseudomonas putida*

To begin with, most bacteria live attached to surfaces in matrix- enclosed communities known as biofilms. Members of the genus *Pseudomonas* are no exception, they have been shown to form biofilms root surfaces. Certain species, such as *P. putida* in association with plants are able to promote plant growth by suppressing soil-born pathogenes, producing antifungal antibiotics (including certain siderophores) and triggering induced systematic resistance in the host. Two-component signal transduction system GacS/GacA is a key regulator of biofilm formation. GacS is a sensor kinase that detects a yet unknown signal and in turn activates the response regulator GacA.

Despite the importance of GacS/GacA in switching between motile and sessile lifestyle, *gacS* transcription regulation is not fully understood. In our laboratory it has been previously shown that a global regulator Fis binds to *gacS* upstream sequence *in vitro*. In order to better understand *gacS* regulation, it is essential to identify promoters of *gacS*. Therefore, the aim of the present study became to identify promoter(s) of gene *gacS*. In addition to that, promoters for divergent gene PP_1651, involved in iron homeostasis, were searched.

- Two promoters were identified for gene *gacS*. Firstly, P1_{gacS}, with -10 box located -55...-60 nucleotides upstream of the gene. Secondly, P2_{gacS}, with -10 box located -209...-213 nucleotides from the *gacS*.
- Two possible promoters for PP_1651 were also determined. Potential P2_{PP_1651} is positioned -138...-200 and potential P1_{PP_1651} -14...-56 nucleotides upstream of the gene PP_1651.

Kasutatud kirjandus

- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quiriones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 215–237.
- Archibald, F. (1983). *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiology Letters*, 19(1), 29–32.
- Ball, C. A., Osuna, R., Ferguson, K. C., & Johnson, R. C. (1992). Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174(24), 8043–8056.
- Banin, E., Vasil, M. L., & Greenberg, E. P. (2005). Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(31), 11076–11081.
- Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., & Broda, P. (1977). Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Molecular & General Genetics: MGG*, 154(2), 203–204.
- Braun, V., & Killmann, H. (1999). Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(3), 104–109.
- Brencic, A., McFarland, K. A., McManus, H. R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S. L., & Lory, S. (2009). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Molecular microbiology*, 73(3), 434–445.
- Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., & O’Gara, F. (2006). Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology*, 152(2), 405–418.
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., ... Cavard, D. (2007). Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(1), 158–229.
- Chambonnier, G., Roux, L., Redelberger, D., Fadel, F., Filloux, A., Sivaneson, M., ... Bordi, C. (2016). The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Genetics*, 12(5), e1006032.
- Chavez, R. G., Alvarez, A. F., Romeo, T., & Georgellis, D. (2010). The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *Journal of Bacteriology*, 192(7), 2009–2012.

- Cho, K. H., & Kim, J.-H. (2015). Cis-encoded non-coding antisense RNAs in streptococci and other low GC Gram (+) bacterial pathogens. *Frontiers in Genetics*, 6.
- Colombo, C., Palumbo, G., He, J.-Z., Pinton, R., & Cesco, S. (2013). Review on iron availability in soil: Interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of Soils and Sediments*, 14.
- Cornelis, P., & Bodilis, J. (2009). A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads. *Environmental Microbiology Reports*, 1(4), 256–262.
- Cornelis, P., Matthijs, S., & Van Oeffelen, L. (2009). Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioMetals*, 22(1), 15–22.
- Crosa, J. H. (1997). Signal Transduction and Transcriptional and Posttranscriptional Control of Iron-Regulated Genes in Bacteria. *MICROBIOL. MOL. BIOL. REV.*, 61, 18.
- Dean, C. R., Neshat, S., & Poole, K. (1996). PfeR, an enterobactin-responsive activator of ferric enterobactin receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 178(18), 5361–5369.
- Dean, C. R., & Poole, K. (1993a). Cloning and characterization of the ferric enterobactin receptor gene (pfeA) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 175(2), 317–324.
- Dean, C. R., & Poole, K. (1993b). Expression of the ferric enterobactin receptor (PfeA) of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a two-component regulatory system. *Molecular Microbiology*, 8(6), 1095–1103.
- Ferguson, A. D., & Deisenhofer, J. (2002). TonB-dependent receptors—structural perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1565(2), 318–332.
- Filiatrault, M. J., Stodghill, P. V., Bronstein, P. A., Moll, S., Lindeberg, M., Grills, G., ... Schneider, D. J. (2010). Transcriptome Analysis of *Pseudomonas syringae* Identifies New Genes, Noncoding RNAs, and Antisense Activity. *Journal of Bacteriology*, 192(9), 2359–2372.
- Francis, V. I., Waters, E. M., Finton-James, S. E., Gori, A., Kadioglu, A., Brown, A. R., & Porter, S. L. (2018). Multiple communication mechanisms between sensor kinases are crucial for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Communications*, 9(1), 2219.
- Gao, R., Mack, T. R., & Stock, A. M. (2007). Bacterial Response Regulators: Versatile Regulatory Strategies from Common Domains. *Trends in biochemical sciences*, 32(5), 225–234.
- Georg, J., & Hess, W. R. (2011). cis-Antisense RNA, Another Level of Gene Regulation in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2), 286–300.

- Ghysels, B., Ochsner, U., Möllman, U., Heinisch, L., Vasil, M., Cornelis, P., & Matthijs, S. (2005). The *Pseudomonas aeruginosa* *pirA* gene encodes a second receptor for ferrienterobactin and synthetic catecholate analogues. *FEMS Microbiology Letters*, 246(2), 167–174.
- Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. W. (2009). Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 279–294.
- Goodman, A. L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S., & Lory, S. (2004). A Signaling Network Reciprocally Regulates Genes Associated with Acute Infection and Chronic Persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental Cell*, 7(5), 745–754.
- Goodman, A. L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A., & Lory, S. (2009). Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes & Development*, 23(2), 249–259.
- H. Miller, J. (1972). *Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.
- Heeb, S., & Haas, D. (2001). Regulatory Roles of the GacS/GacA Two-Component System in Plant-Associated and Other Gram-Negative Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(12), 1351–1363.
- Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., ... Haas, D. (2004). Positive Control of Swarming, Rhamnolipid Synthesis, and Lipase Production by the Posttranscriptional RsmA/RsmZ System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 186(10), 2936–2945.
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature reviews. Microbiology*, 8(1), 15–25.
- Higgs, P. I., Myers, P. S., & Postle, K. (1998). Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *Journal of Bacteriology*, 180(22), 6031–6038.
- Huertas-Rosales, Ó., Ramos-González, M. I., & Espinosa-Urgel, M. (2016). Self-Regulation and Interplay of Rsm Family Proteins Modulate the Lifestyle of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(18), 5673–5686.

- Imperi, F., Tiburzi, F., & Visca, P. (2009). Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), 20440–20445.
- Kay, E., Dubuis, C., & Haas, D. (2005). Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47), 17136–17141.
- Kay, E., Humair, B., Dénervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., ... Haas, D. (2006). Two GacA-Dependent Small RNAs Modulate the Quorum-Sensing Response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188(16), 6026–6033.
- Koretke, K. K., Lupas, A. N., Warren, P. V., Rosenberg, M., & Brown, J. R. (2000). Evolution of Two-Component Signal Transduction. *Molecular Biology and Evolution*, 17(12), 1956–1970.
- Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(9), 1781–1804.
- Kulkarni, P. R., Jia, T., Kuehne, S. A., Kerkerling, T. M., Morris, E. R., Searle, M. S., ... Kulkarni, R. V. (2014). A sequence-based approach for prediction of CsrA/RsmA targets in bacteria with experimental validation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Research*, 42(11), 6811–6825.
- Köster, W. (2001). ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Research in Microbiology*, 152(3–4), 291–301.
- Lahesaare, A. (2011.). Magistritöö. Globaalse regulaatorvalgu Fis-i seondumine *Pseudomonas putida* raua metabolismis ja biofilmi moodustamises osalevate geenide promootoraladele.
- Moat, A. G., Foster, J. W., Spector, M. P. 2002. *Microbial Physiology, 4th Edition*
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H.-T., & Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology*, 67(2), 241–253.
- Larsen, R. A., Thomas, M. G., Wood, G. E., & Postle, K. (1994). Partial suppression of an *Escherichia coli* TonB transmembrane domain mutation (Δ V17) by a missense mutation in ExbB. *Molecular Microbiology*, 13(4), 627–640.

- Lebreton, A., & Cossart, P. (2016). RNA- and protein-mediated control of *Listeria monocytogenes* virulence gene expression. *RNA Biology*, 14(5), 460–470.
- Loomis, W. F., Shaulsky, G., & Wang, N. (1997). Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes. *Journal of Cell Science*, 110 (Pt 10), 1141–1145.
- Loper, J. E., & Henkels, M. D. (1999). Utilization of Heterologous Siderophores Enhances Levels of Iron Available to *Pseudomonas putida* in the Rhizosphere. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, 65, 7.
- Martínez-Gil, M. (2014). Roles of Cyclic Di-GMP and the Gac System in Transcriptional Control of the Genes Coding for the *Pseudomonas putida* Adhesins LapA and LapF. *Journal of Bacteriology*, 196(8), 1484–1495.
- Martínez-Gil, M., Yousef-Coronado, F., & Espinosa-Urgel, M. (2010). LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Molecular Microbiology*, 77(3), 549–561.
- Martínez-Granero, F., Rivilla, R., & Martín, M. (2006). Rhizosphere Selection of Highly Motile Phenotypic Variants of *Pseudomonas fluorescens* with Enhanced Competitive Colonization Ability. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3429–3434.
- Matthijs, S., Laus, G., Meyer, J.-M., Abbaspour-Tehrani, K., Schäfer, M., Budzikiewicz, H., & Cornelis, P. (2009). Siderophore-mediated iron acquisition in the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* L48 and its close relative *Pseudomonas putida* KT2440. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 22(6), 951–964.
- Mattick, J. S. (2004). RNA regulation: a new genetics? *Nature Reviews Genetics*, 5(4), 316–323.
- Meyer, J. M. (2000). Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology*, 174(3), 135–142.
- Meyer, Jean Marie, & Abdallah, M. A.-E. (1978). *The Fluorescent Pigment of Pseudomonas fluorescens: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties*.
- Meyer, J.-M. (1992). Exogenous siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: possible involvement of porin OprF in iron translocation. *Microbiology*, 138(5), 951–958.
- Miller, J. H. (1992). Miller, Jeffrey H. 1992. *A Short Course in Bacterial Genetics: Laboratory Manual*. Labo. Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1992).

- Moor, H., Teppo, A., Lahesaare, A., Kivisaar, M., & Teras, R. (2014). Fis overexpression enhances *Pseudomonas putida* biofilm formation by regulating the ratio of LapA and LapF. *Microbiology*, 160(Pt_12), 2681–2693.
- Moor, Hanna. (2011). Bakalaureusetöö. *Pseudomonas putida* Fis-i osalemine bakteri liikumise ja biofilmi moodustumise regulatsioonis.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., & Buchanan, S. K. (2010). TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), 43–60.
- Ochsner, U. A., & Vasil, M. L. (1996). Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9), 4409–4414.
- Parkins, M. D., Ceri, H., & Storey, D. G. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 40(5), 1215–1226.
- Patriquin, G. M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E. P., & Poole, K. (2008). Influence of Quorum Sensing and Iron on Twitching Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 190(2), 662–671. 7
- Pernestig, A. K., Melefors, O., & Georgellis, D. (2001). Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 225–231.
- Poole, K., Young, L., & Neshat, S. (1990). Enterobactin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 172(12), 6991–6996.
- Prince, R. W., Cox, C. D., & Vasil, M. L. (1993). Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa* fur gene. *Journal of Bacteriology*, 175(9), 2589–2598.
- Raymond, K. N., Dertz, E. A., & Kim, S. S. (2003). Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3584–3588.
- Sesto, N., Wurtzel, O., Archambaud, C., Sorek, R., & Cossart, P. (2013). The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 75–82.

- Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., & Welsh, M. J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 417(6888), 552.
- Stadtman, E. R., & Berlett, B. S. (1991). Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17201–17211.
- Stazic, D., & Voß, B. (2016). The complexity of bacterial transcriptomes. *Journal of Biotechnology*, 232, 69–78.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 183–215.
- Storz, G., Vogel, J., & Wassarman, K. M. (2011). Regulation by Small RNAs in Bacteria: Expanding Frontiers. *Molecular cell*, 43(6), 880–891.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., ... Cossart, P. (2009). The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature*, 459(7249), 950–956.
- Ventre, I., Goodman, A. L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., ... Filloux, A. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(1), 171–176.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., & Michiels, J. (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 16(10), 496–506.
- Wei, Q., & Ma, L. Z. (2013). Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 20983–21005.
- Winkler, W. C., & Breaker, R. R. (2005). Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annual Review of Microbiology*, 59(1), 487–517.
- Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A., & Brinkman, F. S. L. (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D646–D653.
- Wolanin, P. M., Thomason, P. A., & Stock, J. B. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology*, 3(10), reviews3013.1-reviews3013.8.

Wurtzel, O., Sesto, N., Mellin, J. R., Karunker, I., Edelheit, S., Bécavin, C., ... Sorek, R. (2012).
Comparative transcriptomics of pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species.
Molecular Systems Biology, 8.

Kasutatud veebiaadressid

www.pseudomonas.com

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Johanna Hendrikson,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose "Pseudomonas putida geenide gacS ja PP_1651 promootorid", mille juhendaja on PhD Riho Teras, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Johanna Hendrikson

27.05.2019